



**Ana Patrícia de Abreu
Ribeiro Henriques**

**Uso de bacteriófagos para controlo de *Salmonella*
em avicultura**



**Ana Patrícia de Abreu
Ribeiro Henriques**

**Uso de bacteriófagos para controlo de *Salmonella*
em avicultura**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Dr. Rui Sereno da empresa Controlvet Segurança Alimentar SA.

Apoio financeiro da empresa
Controlvet Segurança Alimentar SA



O júri

Presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Joana Cecília Valente Rodrigues Azeredo
Professora Auxiliar da Escola de Engenharia da Universidade do Minho

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Dr. Rui Manuel Sereno de Castro e Melo
Médico Veterinário do Departamento Técnico – Controlvet

Agradecimentos

Os meus agradecimentos vão para todos os que tornaram este projecto possível, orientando-me no seu planeamento e realização:

À Doutora Adelaide Almeida, orientadora científica no Departamento de Biologia na Universidade de Aveiro, pelo acompanhamento, pela orientação e formação;

Ao Dr. Rui Sereno, por ter facultado todos os meios na Controlvet para a execução deste trabalho. Pelo estímulo, pela formação, pela aposta neste trabalho;

À Dr.^a Ana Martins e ao Dr. João Cotta pela estima e dedicação;

À Ana pelo fascínio que me incutiu pelos fagos, por tudo o que aprendi com ela, pela troca de ideias, pela paciência, pela amizade, pela disponibilidade, pela ajuda;

A todos os colegas da Controlvet, nomeadamente, Dina, Ivone, Margarida, Ricardo, Vera;

Ao Doutor José Matos e à Dr.^a Fernanda Simões do Grupo de Biologia Molecular do INETI;

Mãe, Pai, Miguel, Alexandre e a toda a minha família e amigos,
MUITO OBRIGADA!

Palavras-chave

Salmonella enterica serovar Enteritidis, bacteriófagos, avicultura, fagoterapia.

Resumo

A *Salmonella* surge como um grave problema de produção animal e saúde pública. As infecções em humanos podem ser contraídas através do contacto com animais infectados ou ingestão de alimentos contaminados. A propagação da doença em aves é feita através de rações, água e meio ambiente contaminados. Em avicultura a infecção por *Salmonella* constitui um problema grave sendo a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (frequentemente referida como *Salmonella* Enteritidis) o serotipo predominante (62,1%). *Salmonella* Enteritidis tem a capacidade de sobreviver no interior da célula, dando assim origem a infecções crónicas nas quais o uso de antimicrobianos é sempre de eficácia limitada. Além de pouco eficaz, o uso de antimicrobianos leva ao desenvolvimento de resistências nas populações microbianas assim como à presença de resíduos em alimentos provenientes das populações medicadas.

Os bacteriófagos (fagos) são altamente específicos para um determinado hospedeiro permitindo a destruição da bactéria patogénico alvo. São absolutamente inofensivos para o homem, para os outros animais e para o ambiente do qual fazem parte.

Com o objectivo de testar a eficiência de destruição da *Salmonella* por bacteriófagos, isolaram-se dois fagos a partir de camas de aviário, F1055S e F12013S, e determinou-se o seu espectro de lise contra estirpes de *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves ou alimentos provenientes de aves. Os dois fagos quando aplicados em conjunto lisaram 80 % dos 640 isolados de *Salmonella* Enteritidis.

Foram ainda realizados testes para determinar o período médio de permanência do fago F1055S em dois aviários distintos, tendo-se verificado que este permaneceu 120 dias num dos aviários e 90 dias no outro. Em ambos os casos, a facilidade de isolamento do fago nas camas diminuiu a partir dos 60 dias.

Com vista a testar a eficiência *in vivo* do fago delinearam-se procedimentos experimentais em que se infectaram por spray ovos embrionados com 5 ml de *Salmonella* Enteritidis (3×10^8 CFU/ml). Os ovos infectados foram tratados por spray com 8 ml de uma suspensão do fago F1055S (2×10^6 PFU/ml). O fago F1055S foi eficaz no tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis, tendo-se observado uma redução de 37% nos intestinos e de 12% no coração e no baço.

Devido à longa permanência em camas de aviários e à eficácia demonstrada nas primeiras experiências *in vivo*, assim como ao seu largo espectro, pensa-se que os fagos em questão serão bons candidatos para controlo e terapia das infecções por *Salmonella* Enteritidis em avicultura.

A caracterização morfológica por Microscopia Electrónica de Transmissão indicou que os dois fagos pertencem à ordem *Caudovirales* e à família *Siphoviridae*. Geneticamente os dois fagos são diferentes já que mostram sequências diferentes e diferente organização genética.

Keywords

Salmonella enterica serovar Enteritidis, bacteriophage, poultry, phage therapy.

Abstract

The *Salmonella* is a serious problem of animal production and health. The infections in humans can be contracted through contact with infected animals or ingestion of contaminated food. The spread of the disease in poultry is done through feed, water and environment contaminated. In the poultry infection with *Salmonella* is a serious problem, where the *Salmonella enterica* serovar enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) is the predominant serotype (62,1%). The *Salmonella* Enteritidis has the capacity to survive intracellular, giving rise to chronic infections in which the use of antimicrobials is always of limited effectiveness. Besides inefficient, the use of antimicrobial leads to the development of resistance in microbial populations and to the presence of residues in food from treated poultry.

The bacteriophages (phages) are highly specific to a particular host, allowing the destruction of pathogenic bacteria target. They are absolutely harmless for humans, to other animals and to the environment of which they are part. In order to test the efficiency of destruction of *Salmonella* by bacteriophages, two phages were isolate from beds of aviary, F1055S and F12013S, and evaluated for their spectrum of lyses against strains of *Salmonella* Enteritidis isolated from birds or from foods of birds. The two phages when applied together are acting against 80% of 640 isolates of *Salmonella* Enteritidis.

Tests were also conducted to determine the average period of stay of the phage F1055S in two separate avian and was observed that this phage remained in of the avian during 4 months and in the other 3 months. In both cases, the isolation of this phage from beds decreased after 2 months. In order to test the efficiency of *in vivo* procedures, infect by spray embryonated eggs with 5 ml of *Salmonella* Enteritidis (3×10^8 CFU/ml) were treated by spray by 8 ml of a suspension of phage F1055S with a dose of 2×10^6 PFU/ml. It is concluded that the phage was effective in the treatment of embryonated eggs infected with *Salmonella* Enteritidis, this was seen reducing them by 37% in the intestines and by 12% in the heart and the spleen.

Due to the long stay in bed for avian and effectiveness demonstrated in the first experiments *in vivo* as well as its broad infection spectrum, we think that the two phages will be good candidates for use in the control and therapy of *Salmonella* Enteritidis.

Morphological characterization by Microscopy Electronic Transmission indicates that the two phages belong to the order of *Caudovirales* and to the family of *Siphoviridae*. Genetically the two phages are different as that show different sequences and different genetic organization.

Índice geral

Índice de figuras	11
Índice de tabelas	13
Lista de abreviaturas	15
 Capítulo 1	
1. Introdução	16
1.1. Os bacteriófagos	17
1.2. Princípios da infecção dos bacteriófagos	19
1.2.1. Estrutura e composição da parede celular dos hospedeiros bacterianos	19
1.2.2. Estratégias de infecção bacteriofágica	20
1.3. Resistências bacterianas aos antibióticos	21
1.4. Bacteriófagos como alternativa aos antibióticos no controlo de infecções	22
1.5. Incidência de <i>Salmonella</i> na indústria avícola em Portugal	25
 Capítulo 2	
2. Selecção de isolados de <i>Salmonella</i> patogénicos a partir de aves	28
2.1. Introdução	29
2.2. Material e métodos	31
2.2.1. Isolamento de <i>Salmonella</i>	31
2.2.2. Serotipificação dos isolados de <i>Salmonella</i>	32
2.3. Resultados	33
2.3.1. Serotipificação dos isolados de <i>Salmonella</i>	33
2.4. Discussão	34
 Capítulo 3	
3. Isolamento, produção, purificação e caracterização de fagos	36
3.1. Introdução	37
3.2. Material e métodos	38
3.2.1. Isolamento de fagos	38
3.2.2. Selecção dos fagos	39

3.2.3. Produção de fagos	40
3.2.4. Determinação do título fágico por contagem de PFUs (Plaque Forming Units)	40
3.2.5. Caracterização morfológica	41
3.2.6. Caracterização genética	41
3.2.6.1. Purificação do material genético dos fagos	41
3.2.6.2. Restrição enzimática dos fagos	42
3.2.6.3. Análise RAPD dos fagos	42
3.2.6.4. Análise das sequências dos fagos	42
3.2.6.5. Desenho de sondas para trabalhos posteriores	43
3.3. Resultados	43
3.3.1. Isolamento e selecção dos fagos	43
3.3.2. Produção e purificação	44
3.3.3. Caracterização morfológica	44
3.3.4. Caracterização genética	46
3.3.4.1. Purificação do material genético de fagos	46
3.3.4.2. Restrição enzimática dos fagos	47
3.3.4.3. Análises RAPD dos fagos	47
3.3.4.4. Análise das sequências dos fagos	48
3.3.4.5. Desenho de sondas para trabalhos posteriores	48
3.4. Discussão	49
 Capítulo 4	
4. Experiências <i>in vivo</i>	51
4.1. Introdução	52
4.2. Material e métodos	52
4.2.1. Determinação da eficácia do tratamento de ovos embrionados infectados com <i>Salmonella</i> Enteritidis por suspensões fágicas	52
4.2.2. Determinação do tempo de sobrevivência do fago de <i>Salmonella</i> Enteritidis em aviários	53
4.2.3. Determinação do tempo de sobrevivência do fago de <i>Salmonella</i>	

Enteritidis <i>in vitro</i>	54
4.2.4. Sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis em camas infectadas experimentalmente e tratadas com fago F1055S <i>in vitro</i>	54
4.2.5. Análise estatística	55
4.3. Resultados	55
4.3.1. Determinação da eficácia do tratamento de ovos embrionados infectados com <i>Salmonella</i> Enteritidis por suspensões fágicas	55
4.3.2. Determinação do tempo de sobrevivência do fago de <i>Salmonella</i> Enteritidis em aviários	57
4.3.3. Eficácia do fago no tratamento de camas infectadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>in vitro</i>	58
4.3.4. Sobrevivência da <i>Salmonella</i> em camas infectadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis e tratadas com fago F1055S <i>in vitro</i>	58
4.4. Discussão	60
 Capítulo 5	
5.Discussão final	62
 Capítulo 6	
6. Trabalhos futuros	65
 Bibliografia	66
 Anexos	74

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura de um bacteriófago tipo T4 (Adaptado de www.encarta.msn.com).

Figura 2 – Esquema da parede celular de organismos Gram positivos (Adaptado de Madigan *et al*, 2003).

Figura 3 – Esquema da parede celular de organismos Gram negativos (Adaptado de Madigan *et al*, 2003).

Figura 4 – Ciclo lítico e lisogénico de um bacteriófago (Adaptado de www.encarta.msn.com).

Figura 5 – Comparação entre o número total de isolados testados e o número de resistências obtidas para cada antibiótico testado (dados do Laboratório de Microbiologia da empresa Controlvet).

Figura 6 – Órgãos de aves com quadro lesional indicativo de salmonelose: onfalites, pericardite e perihepatite.

Figura 7 – Cadáver de pinto com lesões de salmonelose: fígado com focos de necrose hepática.

Figura 8 – Taxa de isolamentos de *Salmonella* em amostras provenientes da produção primária e de amostras alimentares. Resultados obtidos tendo como base a proporção do número de isolamentos positivos em relação ao número total de amostras analisadas para cada grupo (dados do Laboratório de Microbiologia da empresa Controlvet).

Figura 9 – *Salmonella* em meio selectivo de kligler (teste de confirmação).

Figura 10 – Serótipos de *Salmonella* isolados em 640 amostras relativas a aves, alimentos provenientes de aves e produtos da produção primária.

Figura 11 – Amostra de camas de aviário (A) e suspensão das camas (B).

Figura 12 – Imagens obtidas por TEM dos fagos (A) F1055S (ampliação: 200 000×) e (B) F12013S (ampliação 200 000×).

Figura 13 – DNA genômico extraído dos fagos F1055S e F12013S, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. 1- Marcador molecular; 2- F1055S; 3- F12013S.

Figura 14 – Digestão do DNA dos fagos F1055S e F12013S, respectivamente, com três enzimas de restrição, *EcoRV*, *SmaI* e *HindIII*, em gel de agarose.

Figura 15 – Amplificação por RAPD do DNA dos fagos F1055S e F1213S, respectivamente.

Figura 16 – Sonda desenhada para os fagos F1055S e F12013S.

Figura 17 – Condições de incubação dos pintos para um dos grupos usados na experiência de infecção de ovos embrionados.

Figura 18 – Variação do teor de *Salmonella* Enteritidis em camas de aviário tratadas com o fago F1055S após infecção com a bactéria. As barras de erro representam o desvio padrão.

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação dos bacteriófagos por famílias, segundo a morfologia e o tipo de ácido nucleico (Grabow, 2001).

Tabela 2 – Comparação entre bacteriófagos e antibióticos como agentes terapêuticos em infecções microbianas. Adaptado de Sulakvelidze *et al* (2001), Clark (2006), Carlton (1999) e Inal (2003).

Tabela 3 – Percentagem de lise dos fagos seleccionados para os vários isolados de *Salmonella*, 1508 para o fago F1055S e 640 para o fago F12013S.

Tabela 4 – Determinação do título dos fagos F1055S e F12013S produzidos por dois métodos de produção.

Tabela 5 – Dimensões dos fagos F1055S e F12013S observados por TEM.

Tabela 6 – Número total de pintos sobreviventes, peso médio dos pintos, número de pintos com artrites (coxos) e com “pasting” nos três grupos no final da experiência.

Tabela 7 – Percentagens de *Salmonella* nos intestinos e noutros órgãos nos três grupos de pintos em teste.

Tabela 8 – Análise estatística com o teste não paramétrico Mann-Whitney das diferenças observadas no número de artrites, “pasting”, presença de *Salmonella* e de fago nos intestinos e nos órgãos (valores de p).

Tabela 9 – Teste de lise em amostras colhidas mensalmente nas camas dos aviários. Número de amostras positivas em relação ao número de amostras analisadas.

Tabela 10 – Teste de lise em amostras colhidas mensalmente em camas *in vitro*. Número de amostras positivas em relação ao número de amostras analisadas.

Tabela 11 – Análise estatística ao longo do tempo no grupo de aves tratado com o fago F1055S, método de Mann-Whitney (valores de p).

Tabela 12 – Análise estatística entre grupos de aves controlo e o grupo de aves infectado com *Salmonella* e tratado com fago ao longo do tempo (15 dias), método de Mann-Whitney.

Lista de Abreviaturas

APT Água Peptonada Tamponada
BLAST Basic Local Alignment Search Tool
BURD 5-bromo-2-desoxiuridina
cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar
CFU Colony Forming Units
DNA Ácido desoxirribonucleico
dsDNA Ácido desoxirribonucleico da cadeia dupla
dsRNA Ácido ribonucleico da cadeia dupla
EDTA Ethylene Diamine TetrAcetic Acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EIBMV Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology
HIET Hirszfild Instituten of Immunology and Experimental Therapy
FDA Food and Drug Administration
ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses
IPTG Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LPS Lipopolissacarídeos
NCBI National Centre for Biotechnology Information
PCR Polimerase Chain Reaction
PEG Polietilenoglicol
PFU Plaque Forming Units
PVDF Polyvinylidene fluoride
RAPD Random Amplified Polymorphic DNA
RNA Ácido ribonucleico
SMID *Salmonella* Detection and Identification Medium
SEM Microscopia Electrónica de Varrimento
ssDNA Ácido desoxirribonucleico da cadeia simples
ssRNA Ácido ribonucleico da cadeia simples
TEM Microscopia Electrónica de Transmissão
TS Triptona Sal

Capítulo 1.

1. Introdução

1.1. Os bacteriófagos

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam e destroem bactérias (Figura 1), o que lhes confere um ótimo potencial para prevenir e tratar doenças bacterianas e eliminar organismos patogênicos transmitidos através dos alimentos. Foram descobertos no início de 1900, independentemente por Twort (1915) e d'Herelle (1917) (Grabow, 2001). Depois da descoberta dos bacteriófagos, o seu potencial para prevenir e tratar infecções bacterianas foi investigado obtendo-se resultados controversos. A inconsistência dos fagos para tratar infecções bacterianas, associada à descoberta dos antibióticos, conduziu a uma diminuição no interesse na terapia fágica. Actualmente, existe um interesse renovado nesta terapia devido às consequências da resistência aos antibióticos no tratamento de infecções bacterianas em animais e humanos. A utilização de antibióticos na produção animal é uma ameaça para a saúde humana devido ao aparecimento de resistências aos antibióticos na produção animal o que, posteriormente, torna difícil o tratamento de infecções em humanos. Consequentemente, têm sido tomadas algumas medidas para restringir o uso de antibióticos na produção animal (Regulamento Comunitário (EEC) nº 2377/90, de 26 de Junho de 1990).

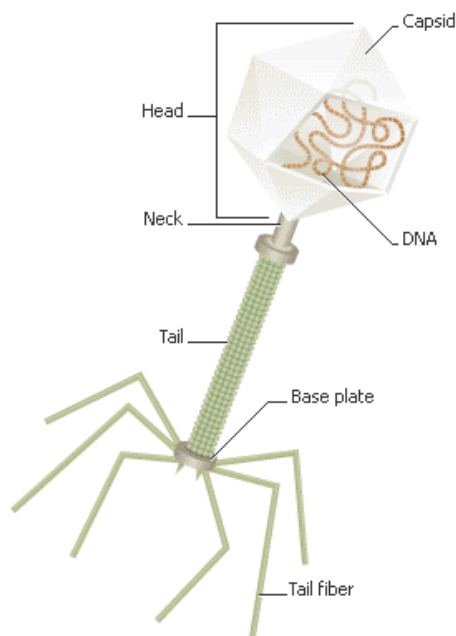


Figura 1 – Estrutura de um bacteriófago tipo T4 (Adaptado de www.encarta.msn.com).

Os fagos são, no geral, semelhantes aos outros vírus e são constituídos essencialmente por dois componentes, o ácido nucleico e as proteínas. Dependendo do fago, o ácido nucleico pode ser de DNA ou RNA mas nunca os dois em simultâneo e pode ser de cadeia dupla ou de cadeia simples (Tabela 1). Podem apresentar diferentes tamanhos e formas. Alguns são icosaédricos, formados por uma cápside, outros filamentosos. A cápside é composta por várias cópias de uma ou mais proteínas diferentes. No interior da cabeça encontra-se o ácido nucleico. A cápside funciona como uma capa protectora para o ácido nucleico. Alguns fagos possuem uma cauda que se liga à cabeça. A cauda é uma espécie de tubo rígido ou flexível através do qual o ácido nucleico passa, durante a infecção, para o hospedeiro (Inal, 2003).

Mais de 5100 fagos foram examinados desde 1959. Pelo menos 4950 (96%) possuem cauda e pertencem à ordem Caudovirales e a três famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* (Dabrowska, 2005).

Tabela 1 – Classificação dos bacteriófagos por famílias, segundo a morfologia e o tipo de ácido nucleico (Grabow, 2001).

Família	Cápside	Ácido nucleico	Cauda	Exemplo
<i>Myoviridae</i>	Cúbica (icosaédrica ou alongada)	Linear de cadeia dupla (dsDNA)	Longa e contráctil	T4, T2, P1 e <i>Mu</i>
<i>Siphoviridae</i>	Cúbica (icosaédrica)	Linear de cadeia dupla (dsDNA)	Longa e não contráctil	T5 e λ
<i>Podoviridae</i>	Cúbica (icosaédrica)	Linear de cadeia dupla (dsDNA)	Pequena e não contráctil	T7 e P22
<i>Microviridae</i>	Cúbica (icosaédrica)	Circular de cadeia simples (ssDNA)	Ausente	Φ X174
<i>Corticoviridae</i>	Icosaédrica	Circular de	Ausente	PM2

	com lípidos	cadeia dupla (dsDNA)		
<i>Tectiviridae</i>	Dupla icosaédrica com lípidos	Linear de cadeia dupla (dsDNA)	Se presente não é contráctil	PRD1
<i>Leviviridae</i>	Cúbica (icosaédrica)	Linear de cadeia simples (ssRNA)	Ausente	MS2 e Q β
<i>Cystoviridae</i>	Icosaédrica, invólucro lipídico,	Linear de cadeia simples segmentado (dsRNA)	Ausente	Φ 6
<i>Plasmaviridae</i>	Invólucro, pleomórfica	Circular de cadeia dupla (dsDNA)	Ausente	L2
<i>Inoviridae</i>	Invólucro, filamentosa	Circular de cadeia simples (ssDNA)	Ausente	f1, fd, M13 e MV-L51

1.2. Princípios da infecção dos bacteriófagos

1.2.1. Estrutura e composição da parede celular dos hospedeiros bacterianos

A parede celular das bactérias pode ser espessa e homogénea, bactérias Gram positivas (Figura 2), ou fina e heterogénea, bactérias Gram negativas (Figura 3). Nas bactérias Gram positivas a parede é formada por uma camada espessa de peptidoglicano que por sua vez é formado por dois açúcares, a glucosamina e o ácido murâmico, e por uma cadeia curta de quatro aminoácidos. Nas bactérias Gram negativas a parede é formada por uma camada mais fina de peptidoglicano e por uma outra camada externa, a membrana externa. A membrana externa é dupla, sendo a face interna constituída por fosfolípidos e a face externa formada essencialmente por lipopolissacarídeos.

Internamente à parede celular existe a membrana citoplasmática, que é formada por fosfolípidos e proteínas.

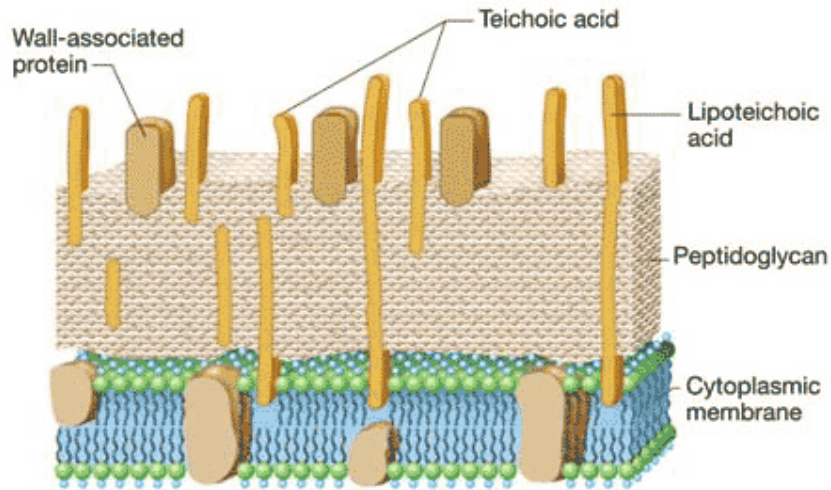


Figura 2 – Esquema da parede celular de organismos Gram positivos (Adaptado de Madigan *et al*, 2003).

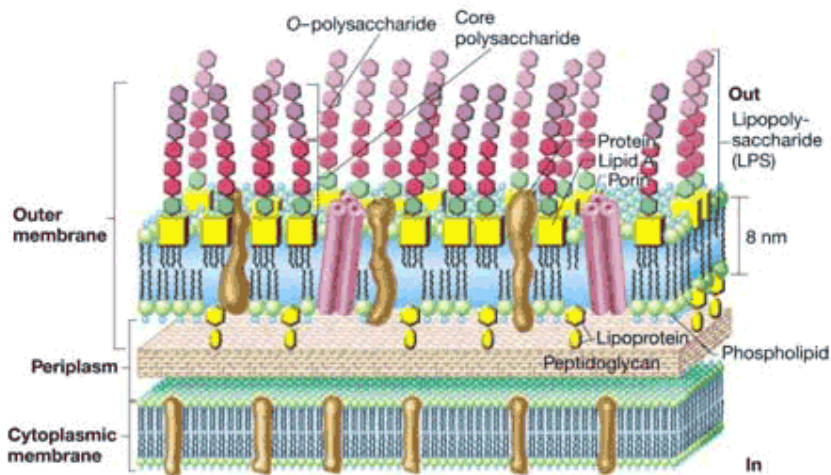


Figura 3 – Esquema da parede celular de organismos Gram negativos (Adaptado de Madigan *et al*, 2003).

1.2.2. Estratégias de infecção bacteriofágica

O primeiro passo no processo de infecção é a adsorção do fago à célula bacteriana. Este passo é mediado pelas fibras da cauda ou por outra estrutura análoga. As fibras da cauda aderem a receptores específicos na bactéria e a especificidade do hospedeiro do fago

é normalmente determinada pelo tipo das fibras da cauda que o fago possui. A natureza dos receptores bacterianos varia entre as bactérias e inclui proteínas, LPS, pili, lipoproteínas, flagelos, entre outros. A adesão do fago com cauda contráctil à bactéria é irreversível e resulta na contracção da cauda. Quando o fago adere a célula hospedeira o ácido nucleico passa da cabeça para a cauda e entra na bactéria. Os fagos que não possuem cauda, ou cuja cauda não é contráctil, utilizam outros mecanismos para penetrar no interior da célula bacteriana. Alguns fagos possuem enzimas que digerem vários componentes do invólucro bacteriano. Normalmente o único componente do fago que entra na célula é o ácido nucleico, o resto do fago fica fora da bactéria.

Fagos líticos ou virulentos são fagos que se multiplicam no interior da bactéria, destruindo-a no final do ciclo de vida. Fagos temperados integram o seu ácido nucleico no genoma do hospedeiro – profago. Estes fagos só se dividem quando a célula hospedeira se divide, mas por alteração dos factores ambientais pode entrar no ciclo lítico. Na maior parte dos casos o DNA integra o cromossoma do hospedeiro, replica-se com ele e passa para as células filhas (Figura 4) (Sulakvelidze, 2001; Huff, 2005 e Skurnik, 2006).

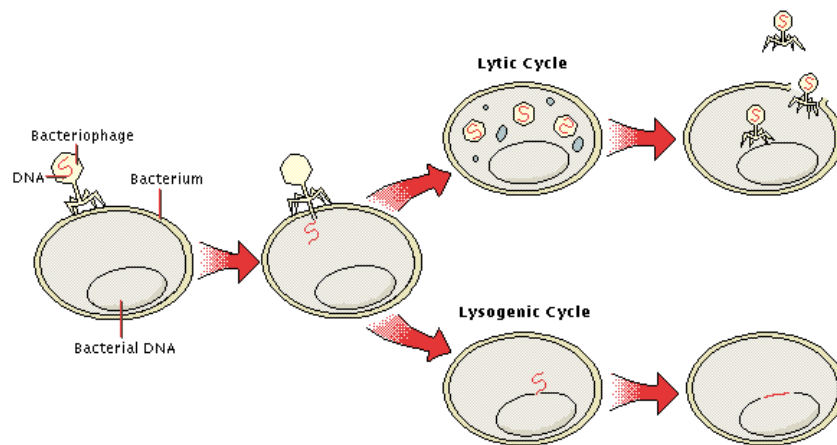


Figura 4 – Ciclo lítico e lisogénico de um bacteriófago (Adaptado de www.encarta.msn.com).

1.3. Resistências bacterianas aos antibióticos

Muitos dos isolados em avicultura, nomeadamente no laboratório Controlvet, são resistentes a vários antibióticos disponíveis para uso em avicultura, limitando assim o

número de antibióticos eficazes nesta área. No caso do Laboratório de Microbiologia da empresa Controlvet, isolados de *Salmonella* (1 de Outubro de 2006 e 10 de Abril de 2007) procedentes de vários locais do país, a partir de bandos infectados e com processos patológicos activos mostraram resistência a vários destes antibióticos usados em avicultura (Figura 5). Os resultados indicam que os antibióticos considerados de 1ª linha no tratamento de infecções e particularmente, de salmonelose humana apresentam uma elevada percentagem de resistências, ampicilina 26%, amoxicilina 24%; amoxicilina e ác. clavulânico 10%; cefotiofur 6%; trimetoprim e sulfas 35%. Como consequência da pressão no sentido de diminuir o uso de antibióticos, o tratamento terapêutico com estes químicos está bastante limitado (García, 2000).

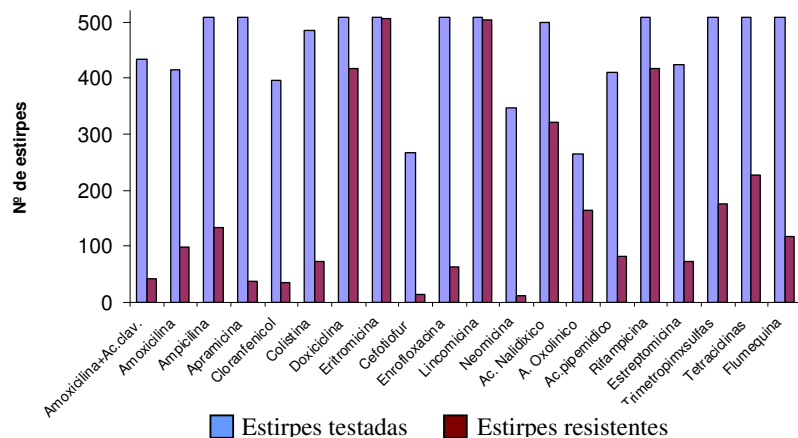


Figura 5 – Comparação entre o número total de isolados de *Salmonella* testados e o número de resistências obtidas para cada antibiótico testado (dados do Laboratório de Microbiologia da empresa Controlvet).

1.4. Bacteriófagos como alternativa aos antibióticos no controlo de infecções

Alexander Fleming referiu, há 60 anos atrás na leitura do Nobel, que as bactérias iriam desenvolver resistências aos antibióticos. Realmente, recentemente tem-se testemunhado o aumento crescente e a disseminação da resistência aos antibióticos. As infecções causadas por bactérias multiresistentes que não podem ser tratadas por antibióticos e, por outro lado, a insignificante taxa de descoberta de novos antibióticos durante os últimos 20 anos têm forçado a exploração de novas alternativas. O tratamento

de infecções por bacteriófagos que inactivam especificamente patogénicos infectantes, pelo processo de terapia fágica, é considerado como uma alternativa ao uso dos antibióticos. As infecções bacterianas em humanos, animais e plantas são potenciais alvos para a terapia fágica. Por outro lado, a terapia fágica preventiva pode eliminar bactérias patogénicas de produtos alimentares e águas (Skurnik, 2007).

A terapia fágica tem sido particularmente útil no tratamento de infecções bacterianas que são resistentes a outros tratamentos e no controlo de doenças, particularmente, epidemias frequentes em países desenvolvidos (Skurnik, 2007). A terapia fágica também pode substituir a utilização de antibióticos, talvez o maior contribuinte para o rápido crescimento da resistência microbiana na agricultura, piscicultura e avicultura (Tabela 2) (Skurnik, 2007).

Inúmeros sucessos na terapia fágica em Medicina Veterinária foram reportados por Berchiery Jr. *et al* (1991); Sklar e Joerger, (2001), Fiorentin *et al* (2003) e Goode *et al* (2003), que realizaram estudos que incidiram no controlo de infecções de *Salmonella* em frangos e consequente diminuição dos riscos de contaminação nos produtos de origem avícola.

A gama de hospedeiros dos bacteriófagos é determinada pelas estruturas à superfície que os fagos utilizam como receptores para aderir à bactéria. São conhecidos receptores de hidratos de carbono e de proteínas. Existem alguns fagos com um largo espectro de hospedeiros e estes podem ser utilizados para fins terapêuticos. Contudo, do ponto de vista biotecnológico a especificidade dos bacteriófagos está em mudança, o que implica que, em terapia fágica se devem usar fagos terapêuticos “costurados” ou um cocktail de fagos para cada bactéria individualmente (Skurnik, 2007). O desafio é vasto dado que existem centenas de espécies patogénicas, potenciais alvos para terapia fágica e a maior parte das espécies podem conter dúzias de serótipos ou genótipos que podem ser susceptíveis a diferentes fagos. Consequentemente, para cobrir todas as doenças infecciosas, seria necessário um banco de centenas de fagos com diferentes especificidades. Assim sendo, parece razoável começar por casos mais específicos, como é o caso da avicultura (Skurnik, 2007).

Aliado à enorme diversidade de fagos na natureza que constituem um recurso ilimitado de novos materiais, um vasto conhecimento dos bacteriófagos e das suas características, propriedades, métodos de isolamento e purificação tem sido acumulado

durante anos. Esta informação deve ser utilizada para desenvolver fagos como agentes terapêuticos. Os fagos escolhidos para fins terapêuticos devem estar bem caracterizados, sequenciados e a sua eficácia deve ser tratada *in vivo* (Skurnik, 2007).

Os desafios para um lançamento de sucesso de um produto terapêutico fágico são muitos. Para os produtos destinados ao uso humano, como é lógico, são requeridos requisitos mais apertados de qualidade. O futuro da terapia fágica, no entanto, será determinado pelas atitudes das autoridades de saúde, que terão sempre de autorizar a utilização de fagos no tratamento e prevenção de infecções (Skurnik, 2006; Skurnik, 2007).

Tabela 2 – Comparação entre bacteriófagos e antibióticos como agentes terapêuticos em infecções microbianas. Adaptado de Sulakvelidze *et al* (2001), Clark (2006), Carlton (1999) e Inal (2003).

Bacteriófagos	Antibióticos	Comentários
Altamente específicos (i.e. normalmente afectam apenas as bactérias alvo); as probabilidades de desenvolverem infecções secundárias estão afastadas.	Os antibióticos têm como alvo microrganismos patogénicos e a microflora normal, o que afecta o balanço microbiano no paciente, e pode causar graves infecções secundárias.	Especificidade elevada pode ser considerada uma desvantagem dos fagos porque assim a bactéria causadora da doença tem de ser identificada antes da terapia ser iniciada com sucesso. Os antibióticos têm uma probabilidade mais elevada do que os fagos de serem eficazes quando o agente ainda não foi identificado.
Replicam-se no local da infecção e estão disponíveis onde são mais precisos.	São metabolizados e eliminados do organismo e não é necessário concentrarem-se no local da infecção.	O crescimento exponencial dos fagos no local da infecção requer uma administração menos frequente de fagos para

		alcançar um efeito terapêutico óptimo.
Não foram descritos efeitos secundários.	Provocam inúmeros efeitos secundários, tais como desordens intestinais, alergias e infecções secundárias.	Os poucos efeitos secundários dos fagos talvez se devam à libertação de endotoxinas da lise bacteriana <i>in vivo</i> .
Bactérias resistentes aos fagos continuam susceptíveis aos outros fagos que têm alvos similares.	A resistência dos antibióticos não está limitada às bactérias alvo.	Por causa do seu espectro de actividade mais alargado, os antibióticos são seleccionados para muitas bactérias resistentes e não só para mutantes resistentes da bactéria alvo.
Seleccionar novos fagos é um processo relativamente rápido que pode ser realizado em dias ou semanas.	Desenvolver um novo antibiótico é um processo demorado e que pode levar anos.	Argumentos evolutivos suportam a ideia que fagos activos podem ser seleccionados contra cada bactéria resistente aos antibióticos ou aos fagos pelo processo de selecção natural.

1.5. Incidência da *Salmonella* na indústria avícola em Portugal

Salmonella Enteritidis e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) surgem separadas de outros serótipos de *Salmonella* porque, por um lado, estas estirpes são normalmente citadas na legislação de controlo de zoonoses e por outro lado, porque existem diferenças epidemiológicas quando comparadas com outras salmonelas (McMullin, 2004). Estes são os serótipos predominantes associados a doenças em humanos (McMullin, 2004).

A *Salmonella* Enteritidis tem-se tornado mais comum tanto em aves como em humanos desde os anos 80 (McMullin, 2004). A presença de *Salmonella* Typhimurium tem-se mantido relativamente estável (McMullin, 2004).

As infecções em galinhas, perús e patos originam problemas de morbidade de 0 a 90%. Os sintomas de salmonelose apresentados por aves infectadas com estas estirpes são: artrites com coxearas, dejectos líquidos (diarreia), fezes aderidas à cloaca (“pasting”), penas eriçadas, olhos fechados, perda de apetite, entre outros. As lesões post-mortem são: desidratação, enterite, necrose intestinal, focos no fígado resultado de necrose hepática, pericardite, perihepatite, entre outros (Figuras 6 e 7). O tratamento é feito com sulfonamidas, neomicina, tetraciclina, amoxicilina, fluroquinolonas de acordo com a sensibilidade apresentada pelas estirpes de *Salmonella*. Este tipo de infecção está espalhado à escala mundial e afecta diferentes tipos de aves (McMullin, 2004).

O controlo de *Salmonella* na produção primária é um factor fundamental para se conseguir reduzir o número de infecções alimentares provocadas por este agente. A biossegurança é uma das ferramentas essenciais para impedir a contaminação dos bandos de aves com *Salmonella* que coloniza o intestino das aves, sendo eliminada conjuntamente com as fezes, podendo desta forma contaminar outras aves, o ambiente e o produto final (carcaças de aves abatidas e seus derivados).

Existem vacinas mortas e vivas preparadas a partir de culturas atenuadas ou desenvolvidas em laboratório (Villate, 1997). As vacinas vivas, utilizadas em avicultura, utilizam estirpes de *Salmonella* às quais foram retiradas porções conhecidas do seu genoma, responsáveis por factores de virulência. Estas estirpes são assim capazes de colonizar o intestino da ave, desencadear o mecanismo de resposta imunitária, mas não a capacidade de persistir no hospedeiro (Villate, 1997). As estirpes vacinais são ainda geneticamente marcadas de forma a possibilitar a sua diferenciação relativamente às estirpes “de campo”. A vacinação é assim uma medida importante no controlo de *Salmonella* na produção avícola, mesmo não assegurando uma protecção completa relativamente à infecção de um bando, reduz consideravelmente a probabilidade da sua ocorrência.

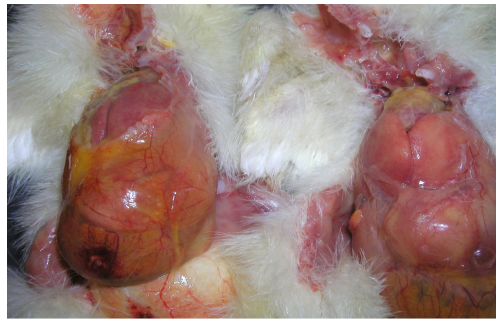


Figura 6 – Órgãos de aves com quadro lesional indicativo de salmonelose: onfalites, pericardite e perihepatite.

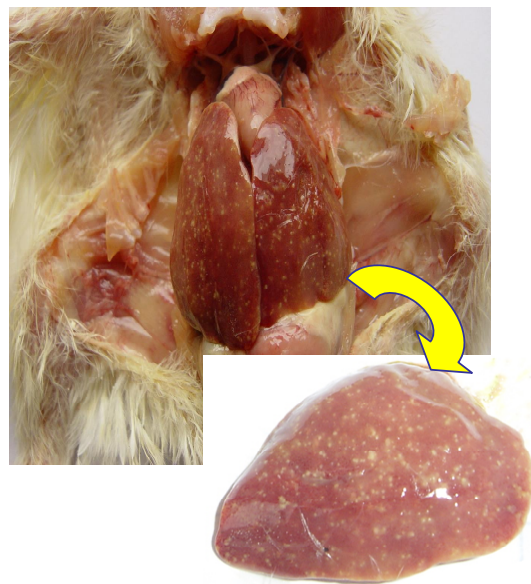


Figura 7 – Cadáver de pinto com lesões de salmonelose: fígado com focos de necrose hepática.

Capítulo 2

2. Selecção de isolados de *Salmonella* patogénicos a partir de aves

2.1. Introdução

A salmonelose aviar é um termo inclusivo que designa um grande grupo de doenças crónicas e agudas causadas por um ou mais membros do género *Salmonella*, o qual é um membro da família *Enterobacteriaceae*.

O género *Salmonella*, nome dado pelo veterinário Daniel E. Salmon (1885), é composto por mais de 2100 serotipos. A *Salmonella* é um microparasita intracelular Gram negativo, móvel ou imóvel, anaeróbico facultativo, descrita pela primeira vez em 1885 como “o bacilo da cólera”. Excepto para o grupo Arizona, até 1966 a maior parte das salmonelas móveis eram designadas com um nome do serotipo (serovar) correspondente à localização geográfica do isolamento inicial. Os serotipos identificados depois desta data têm sido designados pela fórmula antigénica.

Kauffmann propôs que o género *Salmonella* se divida em 4 subgéneros baseados em reacções bioquímicas. Esta divisão foi adoptada pela 8ª edição do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology que inclui a *Salmonella* *Arizonae* como um tipo de espécie do subgénero III. Na recente edição (9ª) deste manual, foi adicionado um novo subgénero V (Snoeyenbos, 1997; Gast, 1997).

A *Salmonella* apresenta uma ampla distribuição na natureza por sobreviver durante longos períodos fora do hospedeiro e por possuir um largo espectro de hospedeiros, tais como mamíferos, aves e répteis (Cruickshank, 1975).

A *Salmonella* é mais resistente a factores ambientais adversos quando comparada com outras Gram-negativas. Cresce entre 8 a 45° C, a pH 4 a 8, com baixos níveis ou sem oxigénio, sobrevive por longos períodos em água (meses) e no solo (anos), é resistente ao sal e ao gelo, mas é sensível ao calor (morre a 70°C), às radiações beta e gama e aos desinfectantes (Cruickshank, 1975).

As salmonelas são oportunistas e a ausência de sintomas na maioria dos animais infectados dificulta a detecção durante as inspecções (Keen, 2004).

As infecções na avicultura são muito comuns, mas raramente resultam em infecções sistémicas agudas excepto em aves jovens sob condições de stress incluindo outras doenças infecciosas, dieta ou alimentação inadequadas ou privação de água (Snoeyenbos, 1997).

O fagotipo 4 de *Salmonella* Enteritidis tem sido o maior problema na Europa central e ocidental durante anos e, recentemente, encontra-se amplamente distribuído na

Inglaterra. Algumas estirpes produzem mais de 20% de mortalidade em aves (Snoeyenbos, 1997). A maior parte das infecções em humanos têm sido atribuídas à transmissão transovárica. Nos Estados Unidos problemas de saúde pública semelhantes, têm sido observados nos últimos 10 anos (Snoeyenbos, 1997).

A maior parte das infecções por salmonela nos humanos devem-se ao manuseamento impróprio dos alimentos, o que permite a multiplicação extensiva da bactéria antes do consumo.

Com a grande expansão da indústria avícola, a ocorrência dispersa da salmonelose aviar tem sido considerada como uma das mais importantes doenças bacterianas na avicultura. Como estas infecções não reconhecem limites internacionais e poucas barreiras hospedeiras, os programas para as controlar têm-se deparado com numerosos obstáculos. A salmonelose avícola é um problema de interesse económico em todas as fases da indústria avícola, da produção ao mercado. Proprietários de lojas de animais, administradores de parques zoológicos, criadores de pombos e aves exóticas estão preocupados com estas doenças. Como a *Salmonella* ocorre em aves e produtos avícolas, as estirpes móveis representam o maior interesse no campo da saúde pública (Snoeyenbos, 1997).

As infecções alimentares provocadas por *Salmonella* têm sido registadas como a forma mais comum de doença de origem alimentar (Saeed, 1999). Nos últimos anos tem aumentado a sua incidência (Figura 8). Associado a este aumento tem estado um serotipo específico, *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis fagotipo tipo 4 (PT4) que tem sido identificado como responsável pela maioria das infecções (Saeed, 1999). Os dados epidemiológicos demonstram que esta forma epidémica de *Salmonella* Enteritidis tem origem, essencialmente, nos produtos de origem avícola. De facto, este tipo de *Salmonella* desenvolveu uma capacidade anormal de se adaptar à produção avícola adquirindo, neste momento, um papel epidemiológico importante nas doenças de origem alimentar. Esta capacidade resulta sobretudo do tropismo desenvolvido pelo serotipo, para o aparelho reprodutor das aves, infectando o ovário e oviducto permitindo-lhe obter uma elevada taxa de sucesso na sua transmissão vertical. Este tropismo invulgar foi demonstrado através de estudos que permitiram isolar *Salmonella* Enteritidis do aparelho reprodutor de aves que não apresentavam o intestino colonizado (Saeed, 1999).

Assim, a partir de aves reprodutoras infectadas, são produzidos pintos infectados que vão disseminar o agente ao longo das várias fases da produção avícola, resultando num

elevado número de produtos alimentares de origem avícola infectados (Guard-Petter, 2001).

A estrutura antigénica do género *Salmonella* é complexa: o antígeno somático O é a endotoxina termoestável (que resiste ao calor) e responsável pela maior ou menor gravidade do choque endotóxico, provoca febres fortes juntamente com graves desordens metabólicas; o antígeno flagelar H, termolábil (destruído pelo calor), está presente nas formas móveis; o antígeno Vi ou antígeno virulento apenas se encontra em determinadas salmonelas, é termolábil e mascara o antígeno O. Todos contribuem para a classificação das salmonelas (Villate, 1997).

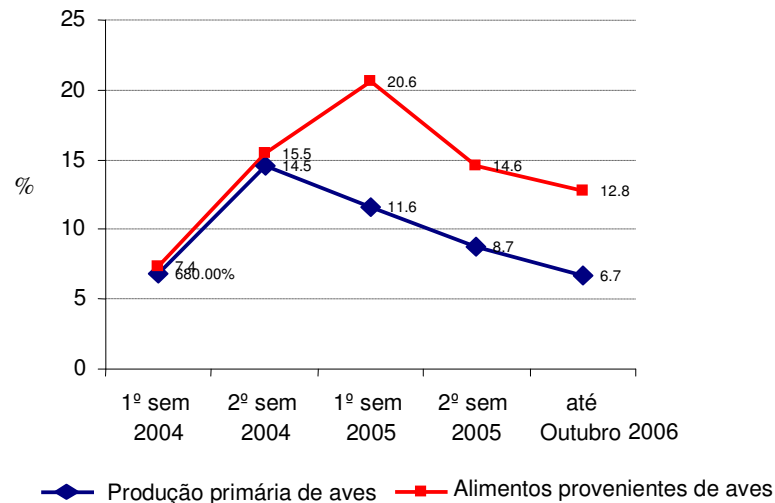


Figura 8 – Taxa de isolamentos de *Salmonella* em amostras provenientes da produção primária e de amostras alimentares (aves e alimentos provenientes de aves). Resultados obtidos tendo como base a proporção número de isolamentos positivos em relação ao número total de amostras analisadas para cada grupo (dados do Laboratório de Microbiologia da empresa Controlvet).

2.2. Material e métodos

2.2.1. Isolamento de *Salmonella*

Um total de 640 isolados de *Salmonella* foram seleccionados de 3585 amostras de aves, alimentos provenientes de aves e de produtos da produção primária (fezes, camas,

ovos embrionados, cadáveres de pintos ou de aves adultas), de várias regiões do país. O trabalho decorreu entre 1 de Outubro de 2006 e 10 de Abril de 2007 no laboratório da Controlvet. As amostras alimentares (aves e alimentos provenientes da aves) foram analisadas utilizando a metodologia da ISO 6579 e as amostras com origem na produção primária foram analisadas utilizando a metodologia do anexo D da referida Norma.

Procedeu-se ao enriquecimento para *Salmonella* em água tamponada peptonada (25g em 225ml) a 37° durante 21±1 horas. Retirou-se 1 ml da amostra enriquecida para 9 ml de tetracionato e incubou-se a 37° durante 21±1 horas. Retirou-se uma ansa de 1µl do meio de tetracionato, semeou-se em SMID e incubou-se a 37° durante 21±1 horas. Fez-se a confirmação das colónias suspeitas em Kligler (Figura 9) e posteriormente a identificação serológica. Os isolados de *Salmonella* foram preservados em meio nutritivo (10g/L triptona; 10g/L peptona; 5g/L NaCl) com 20% de glicerol, à temperatura de – 20°C.

No âmbito deste trabalho, no laboratório de Microbiologia da Controlvet, procedeu-se ainda à realização de um antibiograma para cada isolado tendo como objectivo verificar as resistências a antibióticos veiculadas por cada um deles (Anexo A).



Figura 9 – *Salmonella* em meio selectivo de kligler (teste de confirmação).

2.2.2. Serotipificação dos isolados de *Salmonella*

Para serotipificação dos 640 isolados de *Salmonella*, foram utilizados antisoros DIFCO *Salmonella* O e H. A partir de cada isolado de *Salmonella* procedeu-se à

serotipificação, testaram-se os isolados para os serótipos relevantes (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar) em termos de saúde pública (Regulamento CE nº 1003/2005 de 30 de Junho). Os isolados não aglutinantes para os antisoros específicos destes serótipos foram classificados neste estudo como “outros”.

Os isolados de *Salmonella* após confirmação em meio kligler foram testados na presença dos antisoros O e H. A reacção positiva antigénio anticorpo pode ser observada macroscopicamente pela aglutinação que surge quando se emulsiona a cultura em estudo com o antisoro respectivo. A aglutinação dos antisoros O e H é feita em lâmina e as reacções positivas podem observar-se muito rapidamente após emulsão, com aparecimento de grânulos de aspecto firme (Cruickshank, 1975).

Os antigénios somáticos O foram identificados em primeiro lugar. Os microrganismos com antigénio Vi não aglutinam com antisoros O. Para determinar o antigénio O destas culturas é necessário proceder ao aquecimento da suspensão para destruir o invólucro termolábil e só então testar as culturas com antisoros O.

2.3. Resultados

2.3.1. Serotipificação dos isolados de *Salmonella*

Dos 640 isolados de *Salmonella* 62,1% foram identificados como *Salmonella* Enteritidis; 32,4% como serótipos de *Salmonella* não relevantes para a saúde pública (Figura 10). Os restantes serótipos apresentaram percentagens muito baixas (0,4 a 3,7%).

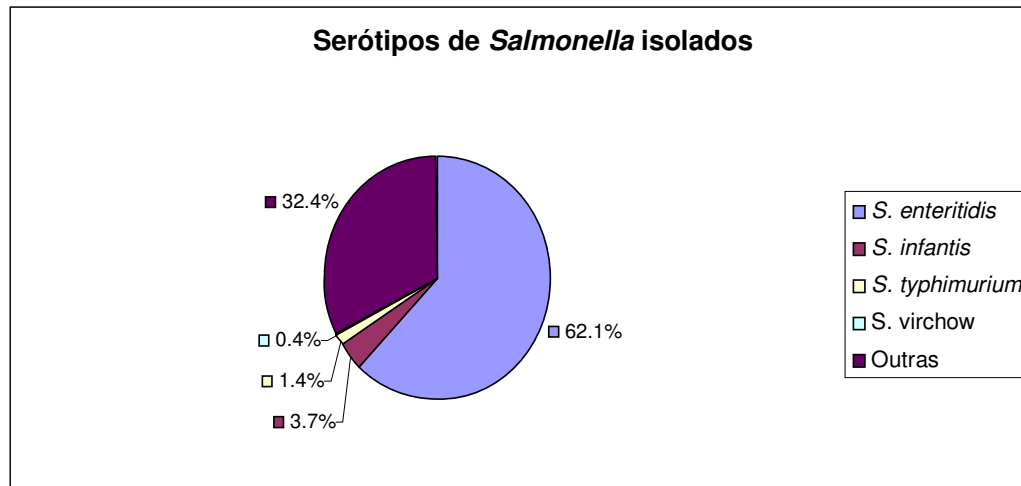


Figura 10 – Serótipos de *Salmonella* isolados em 640 amostras relativas a aves, alimentos provenientes de aves e produtos da produção primária.

2.4. Discussão

As aves domésticas constituem um largo reservatório de *Salmonella* existente na natureza. O género *Salmonella* é pois o mais referenciado em aves talvez devido à existência de programas nacionais activos para o seu isolamento e identificação. De entre os vários serótipos, *Salmonella* Enteritidis é mais frequente em aves e produtos avícolas. Esta situação deve-se a uma afinidade invulgar desenvolvida por este serotipo pelos tecidos dos aparelhos digestivos e reprodutor que torna possível a transmissão vertical.

Neste trabalho, realmente, o serótipo *Salmonella* Enteritidis representou 62,1 % do total das salmonelas isoladas, o que comparado com a incidência deste serótipo na avicultura industrial se encontra dentro dos valores encontrados (72.6%). Embora tenham sido testados os serótipos relevantes em termos de saúde pública, seria interessante identificar as estirpes de *Salmonella* que neste trabalho foram classificadas como “outras”, uma vez que estas atingiram percentagens elevadas (32,4%). Alguns destes isolados também poderão apresentar perigo potencial para a saúde pública.

Na indústria avícola, como indicam os dados do laboratório Controlvet, a resistência a antibióticos por estirpes de *Salmonella* é elevada, atingindo valores de resistência até 35% para os antibióticos de primeira linha (Anexo A). Face a estes

resultados, é necessário desenvolver novas terapias para inactivar salmonelas resistentes a antibióticos.

Capítulo 3

3. Isolamento, produção, purificação e caracterização de fagos

3.1. Introdução

A produção fácil rápida e em grande quantidade de fagos à escala laboratorial indica que este processo pode ser facilmente usado à escala industrial. Como a selecção de novos fagos também é um processo relativamente rápido, pode ser realizado em dias ou semanas, a aplicação da terapia fágica para fins terapêuticos parece ser viável. Pelo contrário, desenvolver um novo antibiótico é um processo demorado e que pode levar anos (Oliveira, 2005).

O método de produção de fagos em meio sólido permite a produção de uma maior concentração de fagos, mas é mais laborioso. Implica a separação por centrifugação antes da filtração para extrair o meio agarizado que caso não fosse removido iria colmatar as membranas durante a filtração, o que de certo modo pode inviabilizar, a sua aplicação industrial. O método de produção em meio líquido pode ser utilizado para produzir fagos em grande escala mas é necessário otimizar as condições, nomeadamente a filtração (Oliveira, 2005).

A optimização das condições de filtração e a procura do compromisso entre a porosidade membranar que permita uma retenção eficaz do bacteriófago mais pequeno e a permeabilidade das endotoxinas mesmo que agregadas, são processos importantes para o sucesso da ultrafiltração.

O conhecimento da morfologia, do tipo de material genético e do tamanho do genoma permite classificar os vírus taxonomicamente com elevado nível de confiança.

Os fagos escolhidos para fins terapêuticos devem estar bem caracterizados, sequenciados e a sua biologia deve ser conhecida.

Para a observação de fagos são utilizadas duas técnicas de microscopia electrónica: a microscopia electrónica de varrimento (SEM) e a microscopia electrónica de transmissão (TEM).

O SEM é usado para estudar a superfície dos vírus. O poder de resolução deste microscópio é de 20 nm e as ampliações de 1000-10 000x (Oliveira, 1995).

No TEM o poder de resolução é de 2,5 nm e as ampliações de 10 000 – 100 000x. O contraste é feito através de sais de alguns metais pesados, tais como chumbo, ósmio, tungsténio e urânio. (Oliveira, 2005).

Devido ao elevado poder de resolução do microscópio electrónico, nomeadamente do TEM, torna-se possível visualizar a morfologia e o tamanho das estruturas que os constituem os fagos. Estas características são muito importantes para a classificação dos fagos (Tabela 1).

A obtenção de informação mais detalhada acerca de cada fago foi feita através do estudo de sequências específicas e conservadas destes vírus, com base na informação do Banco de Genes (NCBI), desenvolvimento de sequências iniciadoras (primers) para amplificação de fragmentos por PCR, sequenciação dos fragmentos, comparação do fragmento sequenciado com sequências do Banco de Genes (BLAST), e utilização de enzimas de restrição que permitem desenhar mapas de identificação de um fago. Conhecendo as características genéticas dos fagos é também possível desenvolver sondas que permitam diferenciar diferentes fagos de outros existentes em culturas mistas.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Isolamento de fagos

Com o intuito de isolar bacteriófagos líticos contra isolados de *Salmonella* Enteritidis, foram colhidas amostras de camas de aviários aleatoriamente (distrito de Aveiro) para sacos estéreis (Figura 11). Cada amostra foi imersa em 250 ml de água tamponada peptonada, APT (Biokar Diagnostics), durante uma hora, à temperatura ambiente, com agitação (150 rpm). De seguida realizou-se a decantação e a centrifugação do sobrenadante a 4000 rpm, 10 minutos. Prepararam-se inócuos de *Salmonella* Enteritidis, procedendo-se à revificação de isolados a partir das amostras armazenadas a -20°C: semeou-se com uma ansa estéril em agar MacConkey (para garantir a viabilidade da cultura e a inexistência de colónias contaminantes) e as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Foram inoculadas algumas colónias de cada placa em 250 ml de meio nutritivo (APT), durante cerca de 6 a 8 horas a 37°C e a 150 rpm. O sobrenadante (100 ml) resultante da centrifugação anterior foi adicionado à suspensão de bactérias, seguindo-se nova incubação durante cerca de 12 horas, a 37°C e a 150 rpm. A suspensão resultante foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de acrodiscos com membranas de porosidade 0,45 µm e em seguida de 0,2 µm.

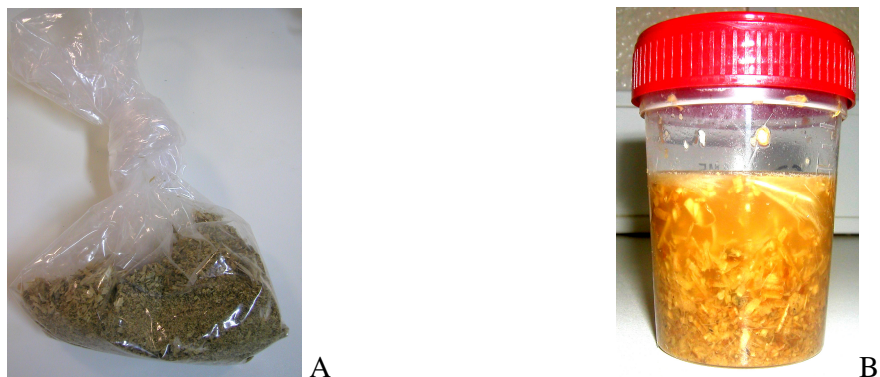


Figura 11 – Amostra de camas de aviário (A) e suspensão das camas (B).

Dispensou-se uma gota (10 μ l) da suspensão filtrada sobre placas de Müeller Hinton agar com de 3 ml de meio nutritivo semi-sólido (0,6%) (10g/L digesta pancreática de caseína; 8g/L de NaCl; 6g/L de agar bacteriológico) inoculado anteriormente com 100 μ l de cada cultura de *Salmonella* activada no passo anterior. Incubaram-se as placas a 37°C durante 24 horas. Verificou-se a presença de fagos líticos, observando a existência ou não de placas de lise (ausência de crescimento bacteriano no local onde foi colocada a suspensão). Quando se verificou a formação de placas de lise, procedeu-se ao isolamento dos fagos: transferiu-se o conteúdo do halo com um fio recto estéril para uma cultura da respectiva estirpe de *Salmonella* Enteritidis hospedeira, com cerca de 3 horas de crescimento em 10 ml de APT e incubou-se a 37°C durante cerca de 8 horas, com agitação. Centrifugou-se a suspensão resultante (4000 rpm) e filtrou-se seguindo o procedimento acima descrito para a pesquisa de fagos.

Foram produzidas cinco suspensões de fagos isolados a partir de diferentes camas de aviários.

3.2.2. Selecção dos fagos

Os 640 isolados de *Salmonella* foram repicados para meio sólido de sangue e para meio sólido MacConkey. Cada um dos isolados bacterianos foi testado através da técnica da dupla camada de agar para as várias suspensões fágicas. O procedimento utilizado foi o descrito para o isolamento dos fagos em 2.2.2. Uma gota de 10 μ l da suspensão de cada fago foi dispensada na camada de meio semi-sólido inoculado previamente com a estirpe

bacteriana a ser testada. Observou-se a presença ou ausência de zona de lise das culturas bacterianas.

3.2.3. Produção de fagos

Realizaram-se dois tipos de procedimentos para produzir e purificar os fagos.

O primeiro baseou-se na mistura de pré-inócuos de suspensões fago-hospedeiro em meio nutritivo (APT) até que a lise fosse visível, ou seja até que a turbidez da suspensão começasse a diminuir significativamente (8 horas aproximadamente, dependendo do tipo de fago). Posteriormente foi feita uma centrifugação (4000 rpm, temperatura ambiente, centrífuga P. SELECTA Mixtasel) e filtração por membranas de 0,2 µm.

No segundo procedimento, utilizaram-se frascos de cultura de tecidos de 100 ml com uma camada fina de meio Müller Hinton agar. Adicionou-se num tubo de ensaio 1 ml de suspensão de fago e 1 ml da suspensão da respectiva bactéria hospedeira crescida durante cerca de 8 horas. Agitou-se no vórtex e após cerca de 15 minutos, inoculou-se no frasco de cultura com meio agarizado (0,6%). Após solidificação, incubaram-se os frascos a 37°C durante 7 a 8 horas. Adicionou-se 30 ml de Triptona Sal (TS) e incubou-se 12 horas a 4°C (período durante o qual o fago deve passar para a fase líquida). Decantou-se então o líquido para um *Erlenmeyer*. Realizou-se uma centrifugação de 15 minutos a 4 000xg e filtrou-se o sobrenadante por membranas de 0,2 µm que foi armazenado a 4°C.

3.2.4. Determinação do título fágico por contagem de PFU's (Plaque Forming Units)

Para a determinar a concentração dos fagos produzidos, foi usado o método de Adams (1959). Este método baseia-se na formação de placas de lise (PFU's) sobre uma placa inoculada com hospedeiro. O número de placas fágicas é equivalente ao número de bacteriófagos existentes em suspensão. Isto é, uma bactéria infectada com fagos liberta novos fagos, que por sua vez formam uma placa de lise na placa. Os fagos libertados na lise bacteriana espalham-se numa forma circular e infectam novas células permitindo o aumento da placa de lise e a sua observação à vista desarmada.

Num tubo de meio semi-sólido (0,6% de agar) foram adicionados 100 µl de suspensão de fago diluído e 100 µl de uma cultura de *Salmonella* em fase exponencial (6-8 horas de crescimento em meio APT). Verteu-se a mistura para uma placa de Petri, previamente preparada com uma camada fina de Müeller Hinton agar. Para cada diluição fágica foram semeadas 3 réplicas. As placas foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Foi contado o número de halos fágicos nos triplicados da melhor diluição.

3.2.5. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada pelo Dr. HW Ackermann, Universidade Laval, Quebec, Canadá ao abrigo do programa PRIME.

As partículas fágicas foram sedimentadas a 25000 × g durante 60 minutos usando uma centrífuga Beckman (Palo Alto, CA) J2-21 com um rotor de ângulo fixo JA 18,1. Os bacteriófagos foram lavados duas vezes em 0,1 M de acetato de amónio (pH 7,0), depositados em grelhas de cobre fornecidas com filmes Formvar revestidas de carbono, coradas com 2% de fosfotungstato de potássio (PT, pH 7,2) e examinadas num microscópio electrónico Philips EM 300.

3.2.6. Caracterização genética

A caracterização genética foi feita no INETI ao abrigo do programa PRIME.

3.2.6.1. Purificação do material genético de fagos

Para a extracção do DNA viral dos fagos de culturas bacterianas utilizou-se o “Lambda Midi kit” da Qiagen e procedeu-se de acordo com as indicações do fornecedor. O volume inicial do lisado utilizado para a extracção do DNA dos fagos foi de 15 – 30 ml. No final eluiu-se o DNA num volume final de 200 µl.

Para confirmar a eficácia da extracção o DNA foi separado por electroforese num gel de agarose (1,5 %).

3.2.6.2. Restrição enzimática dos fagos

O DNA dos fagos foi digerido utilizando enzimas de restrição: *Bam*HI, *Eco*RV, *Bg*III, *Mbo*I, *Kpn*I, *Sma*I e *Hind*III. A escolha das enzimas teve por base locais de restrição de sequências do fago KS7. Para os fragmentos de DNA resultantes da digestão com *Sma*I e *Eco*RV procedeu-se à ligação ao vector pUC18, posteriormente digerido com a enzima *Sma*I. Para os fragmentos digeridos com a enzima *Hind*III, procedeu-se à ligação ao vector pUC18, digerido posteriormente com *Hind*III. No caso dos produtos de PCR obtidos pela amplificação por RAPD, foram clonados em vector pTZ57R (TA Cloning, InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit, Fermentas). Por fim procedeu-se à transformação em *E. coli* JM 109.

Os transformantes foram seleccionados por crescimento em placas de meio suplementado com X-Gal, IPTG e ampicilina e os recombinantes em meio líquido suplementado com ampicilina. Após crescimento bacteriano, o DNA plasmídico dos clones recombinantes foi extraído utilizando o Kit Plasmid DNA Purification, DNA-Spin™ (iNtRON).

3.2.6.3. Análises RAPD dos fagos

Para a amplificação do DNA extraído dos fagos utilizou-se um conjunto de 39 primers de RAPD. As análises RAPD foram realizadas utilizando 50-100 ng de cada amostra de DNA dos fagos e um lote de primers RAPD (primers não publicados). A amplificação do PCR foi realizada utilizando protocolos standard de RAPD (protocolos não divulgados). Os fragmentos de DNA obtidos por RAPD foram visualizados em géis de agarose e clonados utilizando a metodologia de clonagem TA.

3.2.6.4. Análise das sequências dos fagos

Para a sequenciação do DNA plasmídico recombinante utilizou-se o sequenciador automático da Applied Biosystem, 310 Abi Prism Genetic Analyzer.

As sequências de DNA dos fagos foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST para seleccionar as que apresentavam semelhança com as sequências existentes em banco de dados (NCBI).

3.2.6.5. Desenho de sondas para trabalhos posteriores

As sondas para a detecção e discriminação dos fagos foram desenhadas com base em alinhamentos nucleotídeos realizados utilizando o software SequencerTM 4.2.2 (Apple Macintosh).

3.3. Resultados

3.3.1. Isolamento e selecção dos fagos

Das cinco suspensões fágicas isoladas foram seleccionados dois fagos líticos que foram testados contra os isolados de *Salmonella*. Estes foram seleccionados após realização de alguns ensaios prévios de infecção de isolados de *Salmonella*. Foram seleccionados por apresentarem um espectro de lise maior. Estes dois fagos apresentaram espectros de lise alargados, sendo capazes de lisar 80% dos isolados quando usados em conjunto (Tabela 3). Os fagos foram numerados conforme a ordem de isolamento e denominados “F” seguido do número e letra inicial da espécie do hospedeiro (um “S” para “*Salmonella*”) (F1055S e F12013S). É de realçar que todos os fagos formaram placas de lise, sem qualquer crescimento bacteriano nas zonas lisadas.

Tabela 3 – Percentagem de lise dos fagos seleccionados para os vários isolados de *Salmonella*, 1508 para o fago F1055S e 640 para o fago F12013S.

Serótipos	Eficiência lítica dos fagos (%)		
	F1055S	F12031S	F1055S + F12013S
<i>S. Enteritidis</i>	67	78	80
<i>S. Typhimurium</i>	17	53	54
Salmonelas Grupo B	18	68	75
<i>Salmonella</i> sp.	5	6	6
<i>S. Infantis</i>	3	3	3

3.3.2. Produção e purificação

A produção de fago foi feita recorrendo a dois métodos distintos (Tabela 4). Num dos métodos a replicação de fago deu-se em meio de cultura líquido na presença de uma suspensão bacteriana. No outro método a produção realizou-se em meio sólido.

Tabela 4 – Determinação do título dos fagos F1055S e F12013S produzidos por dois métodos de produção.

Bacteriófagos	Título fágico (pfu/ml)	
	Meio líquido	Meio sólido
F1055S	2×10^8	$4,4 \times 10^9$
F12013S	4×10^9	1×10^{10}

3.3.3. Caracterização morfológica

A observação dos fagos F1055S e F12013S por TEM (Figura 12 – A e B, respectivamente) permitiu determinar as suas dimensões.

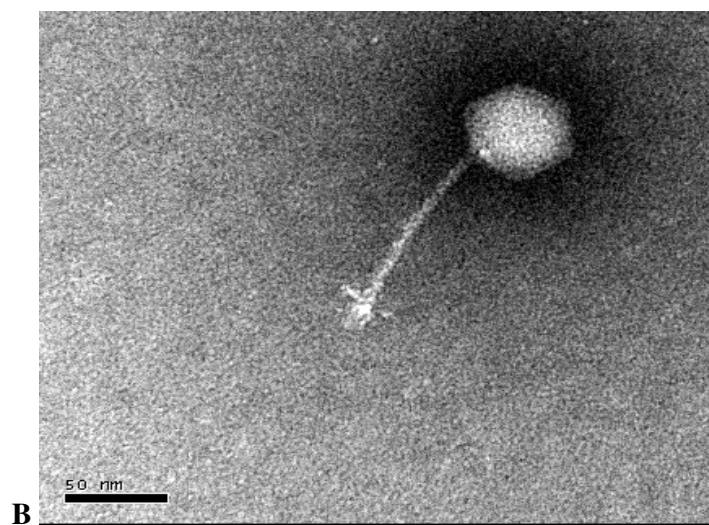
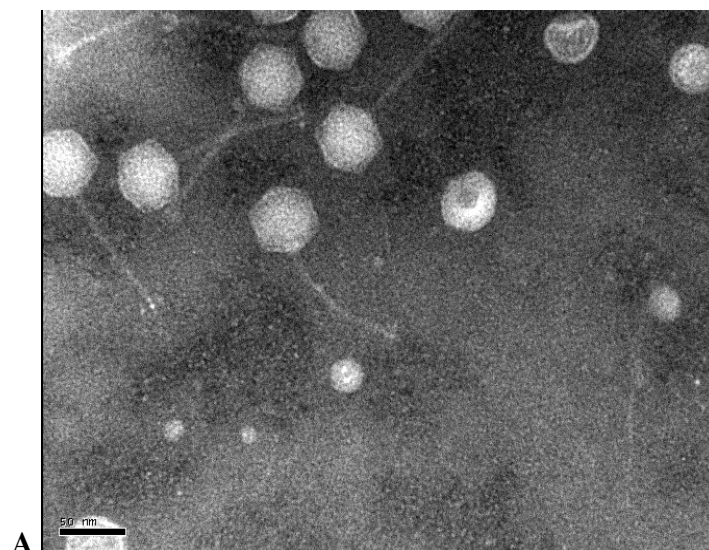


Figura 12 – Imagens obtidas por TEM dos fagos (A) F1055S (ampliação: 200 000×) e (B) F12013S (ampliação 200 000×).

Tabela 5 – Dimensões dos fagos F1055S e F12031S observados TEM.

	F1055S		F12013S	
	Cápsula	Cauda	Cápsula	Cauda
Tamanho real (nm)	55	95	55	95

De acordo com as imagens obtidas por TEM, pode concluir-se que os fagos F1055S e F12013S pertencem à família *Siphoviridae*, tipo T1, caracterizados por uma cauda flexível. Não possuem, como tal, invólucro lipídico e alguns mostram fibras caudais (15 x 5 nm). Os dois fagos pertencem então à ordem *Caudovirales*.

3.3.4. Caracterização genética

3.3.4.1. Purificação do material genético dos fagos

O DNA genómico extraído dos fagos F1055S e F12013S foi analisado por electroforese em gel de agarose, tendo-se observado que o DNA não se apresentava degradado (Figura 13).

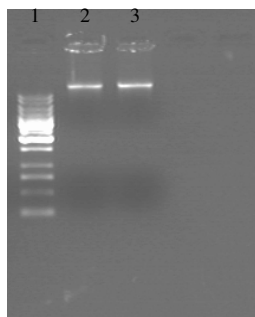


Figura 13 – DNA genómico extraído dos fagos F1055S e F12013S, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. 1-Marcador molecular; 2- F1055S; 3- F12013S.

3.3.4.2. Restrição enzimática dos fagos

Tanto para o fago F1055S como para o fago F12013S apenas se obtiveram fragmentos digeridos com as enzimas *EcoRV*, *SmaI* e *HindIII*. As mesmas enzimas têm perfis de corte diferentes para o fago F1055S e para F12013S (Figura 14).

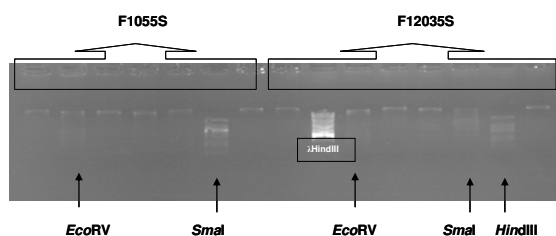


Figura 14 – Digestão do DNA dos fagos F1055S e F12013S, respectivamente, com três enzimas de restrição, *EcoRV*, *SmaI* e *HindIII*, em gel de agarose.

3.3.4.3. Análises RAPD dos fagos

Na amplificação de regiões aleatórias por RAPD, é importante verificar se o perfil dos fragmentos amplificados nos dois fagos e nos respectivos hospedeiros (*Salmonella*) é igual ou diferente. Deste modo, podemos seleccionar os fragmentos de interesse (presença ou ausência do fragmento para o mesmo primer), que poderão ser zonas importantes para desenhar sondas.

Dos 39 primers de RAPD testados para o fago F1055S obteve-se apenas amplificação aleatória de uma região de DNA do fago pelo primer C. Houve amplificação com este primer no hospedeiro H1055S mas apresenta um perfil de amplificação diferente.

No caso do fago F12013S, houve amplificação para os primers C, D e Q, o mesmo aconteceu para o respectivo hospedeiro, embora com perfis diferentes. No caso dos primers B e E só amplificaram para o fago F12013S. Os fragmentos obtidos pela amplificação com os primers B, E e C podem ser potenciais zonas de interesse para se desenhar sondas que permitiriam diferenciar os dois fagos entre si (Figura 15).

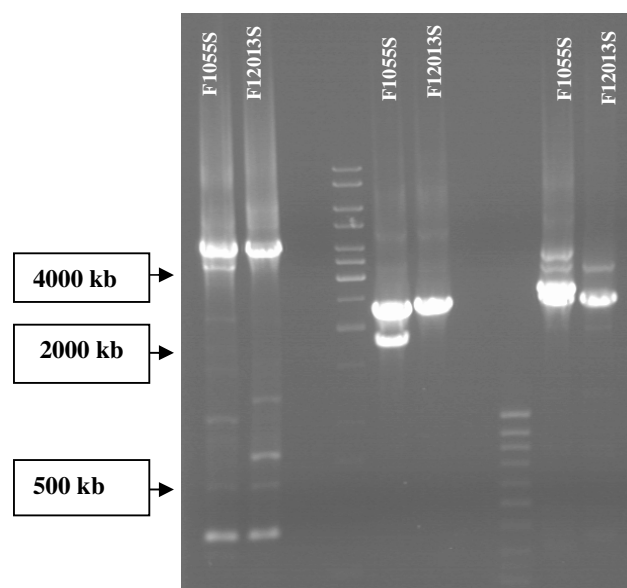


Figura 15 – Amplificação por RAPD do DNA dos fagos F1055S e F12013S, respectivamente.

3.3.4.4. Análise das sequências dos fagos

A partir dos alinhamentos efectuados com as sequências obtidas e tendo em conta a sequência de referência do fago KS7 (sequências que apresentam homologias de 95% com a dos fagos em estudo), procuraram-se zonas com polimorfismos de bases únicas entre os fagos F1055S e F12013S e a de referência KS7, de forma a obter fragmentos específicos para os fagos F1055S e F12013S quando da sua amplificação.

Para ambos os fagos, F1055S e F12013S, o fragmento de DNA que foi sequenciado mostrou baixa identidade com qualquer outra sequência de referência e entre eles.

3.3.4.5. Desenho de sondas para trabalhos posteriores

Um esquema de homologia de fragmentos é mostrado na figura 16, relativo à sequência de referência (sequência do genoma do fago de *Salmonella*).

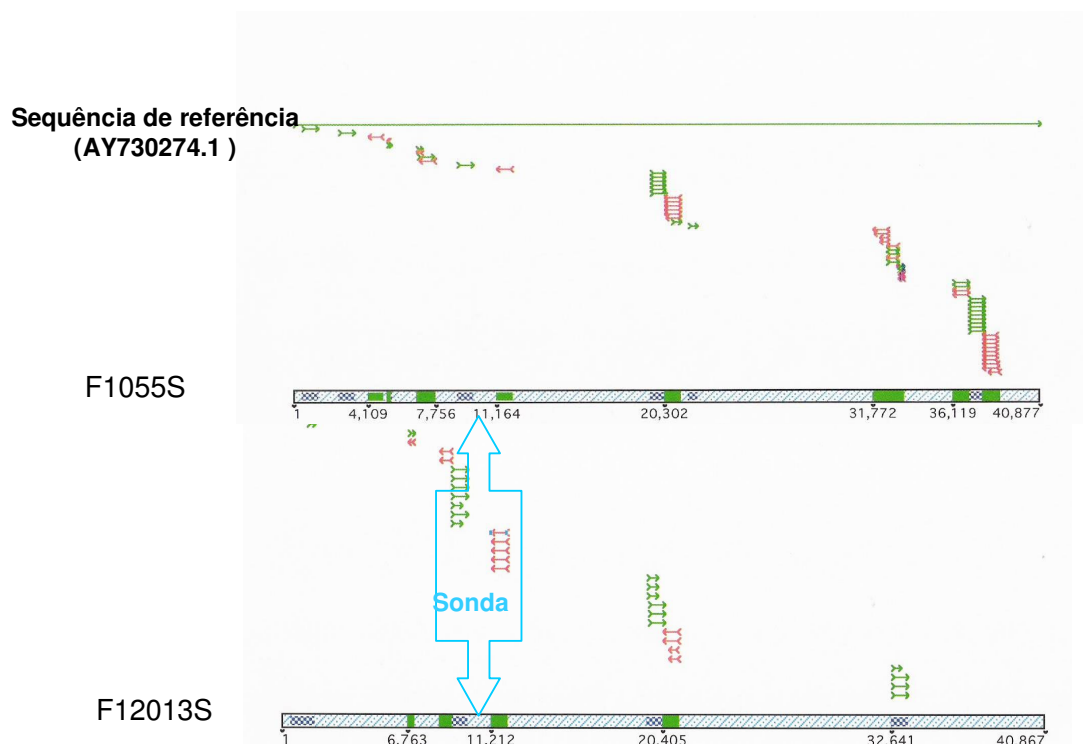


Figura 16 – Sonda desenhada para os fagos F1055S e F12013S.

3.4. Discussão

A elevada frequência de lise viral sobre os vários isolados de *Salmonella* quer a partir da produção primária quer de matrizes alimentares indica que terapia fágica poderá ser uma boa candidata para o controlo da infecção por este microrganismo. Os dois fagos quando aplicados em conjunto lisaram 80% dos vários isolados de *Salmonella*. O fago F12013S foi mais eficaz que o fago F1055S no controlo de qualquer um dos cinco serótipos de *Salmonella*. A percentagem de eficiência lítica pela mistura de fagos foi ligeiramente superior à apresentada pelo fago F12013S para os serótipos de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e de salmonelas do grupo B. Não houve diferença para os serótipos de *Salmonella* sp. e *Salmonella* Infantis.

Os resultados mostram que é possível controlar a infecção por *Salmonella* na produção primária e nas aves (onde reside a origem de grande parte destes microrganismos). A utilização de antibióticos não é, do ponto de vista de saúde pública, a forma mais adequada para o fazer. A fagoterapia anuncia-se assim como uma tecnologia

que pode ser utilizada quer como profilático quer como terapêutico na produção primária ou no abate.

O método de produção de fagos em meio sólido permite a produção de uma maior concentração de fagos em relação ao meio líquido.

A observação ao microscópio electrónico de transmissão permitiu classificar os fagos isolados das camas das galinhas no grupo dos *Caudovirales*, nomeadamente na família *Siphoviridae* por apresentarem tamanho e morfologia característicos deste grupo. O tamanho dos dois fagos é semelhante, cerca de 160 nm, apresentam uma cauda com 95 nm de comprimento. Através desta caracterização foi possível conhecer outras características que já estão descritas para este grupo, nomeadamente a ausência de invólucro lipídico e o tipo de ácido nucleico que possuem, DNA de cadeia dupla. Como os vírus de DNA de cadeia dupla são mais resistentes às condições adversas (pH, radiação, etc.) que os vírus de DNA de cadeia simples e de RNA, estes fagos apresentam assim vantagens para uso na terapia fágica, como são mais resistentes às condições ambientais adversas poderão permanecer no ambiente por períodos alargados não sendo necessário fazer muitas aplicações durante o tratamento. Por outro lado, podem resistir às condições adversas do tracto gastrointestinal quando administrados por via oral.

Foram desenhadas sondas de forma a identificar e diferenciar os fagos F1055S e F12013S em misturas que estão a ser testadas. Os resultados obtidos pela sequenciação confirmam que estas sondas são específicas para cada um dos fagos e que os diferenciam entre si, podendo ser utilizadas numa solução com vista ao controlo ou à prevenção de infecções microbianas por *Salmonella* em aves.

Capítulo 4

4. Experiências *in vivo*

4.1. Introdução

Embora a excreção de *Salmonella* por aves infectadas seja intermitente, apenas uma pequena percentagem de aves excrete *Salmonella* Enteritidis (1-3%) e a percentagem de ovos infectados seja baixa (0,3%), as condições de incubação são propícias ao crescimento de bactérias e a infecção espalha-se (Saeed *et al* 1999). Na eclosão, devido ao pó formado, a infecção passa para todos os pintos.

A disseminação de *Salmonella* Enteritidis nos aviários também ocorre por via digestiva através da transmissão a partir das camas. A aplicação de fagos em camas de aviários poderá assim funcionar como tratamento e como medida preventiva.

A infecção de aves por *Salmonella* pode causar diferentes sintomas, desde artrites, “pasting”, até septicemia. (Saeed *et al* 1999).

O objectivo deste trabalho foi testar a eficácia *in vivo* e *in vitro* dos dois fagos seleccionados. Para tal as suspensões fágicas foram aplicadas em ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis. A sobrevivência destes fagos foi avaliada em aviários de reprodutoras e em camas autoclavadas após pulverização com as suspensões fágicas. Foi possível verificar a eficácia de um dos dois fagos, F1055S, no tratamento de camas infectadas com *Salmonella* Enteritidis *in vitro*.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Determinação da eficácia do tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis por suspensões fágicas

Noventa ovos embrionados, com dezanove dias, livres de *Salmonella*, foram divididos em três grupos de trinta e incubados a $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Um dos três grupos foi usado como controlo tendo sido mantido numa sala separada dos outros dois grupos (grupos teste) que foram tratados com uma suspensão de *Salmonella* Enteritidis, aplicada como spray à concentração de 3×10^8 CFU/ml. Um dos dois grupos teste foi posteriormente tratado com uma suspensão do bacteriófago F1055S aplicada como spray à concentração de 2×10^6 PFU/ml.

Após eclosão, os três grupos de pintos foram colocados em salas separadas, em condições controladas de luz, temperatura e humidade. A quantidade de água e alimento também foi controlada (Figura 17).

Ao fim de oito dias foram avaliados os seguintes parâmetros: mortalidade e morbilidade (número de pintos coxos devido a artrites e o número de pintos com “pasting”). Os animais foram sacrificados e pesados individualmente. Foi efectuada a pesquisa de *Salmonella* e de fagos nos órgãos internos (coração, fígado, baço e intestinos) pelos métodos descritos em 2.2.1. e em 3.2.1., respectivamente.



Figura 17 – Condições de cria dos pintos para um dos grupos usados na experiência de infecção de ovos embrionados.

4.2.2. Determinação do tempo de sobrevivência do fago F1055S de *Salmonella* Enteritidis em aviários

Foi aplicada uma suspensão do bacteriófago F1055S, com a concentração de 1×10^7 PFU/ml, por pulverização nas camas de dois aviários de reprodutoras no distrito de Aveiro, livres de *Salmonella*. O aviário 1 possuía camas mais secas e um teor muito baixo de humidade, enquanto o aviário 2 tinha camas mais húmidas. Foram feitas mensalmente cinco recolhas aleatórias das camas ao longo de cada um dos aviários (área correspondente a 1300 m^2). Foi feito o teste de lise pela técnica descrita em 3.2.1.

4.2.3. Determinação do tempo de sobrevivência dos dois fagos de *Salmonella* Enteritidis *in vitro* (F1055S e F12013S)

Uma amostra das camas que são utilizadas em aviário foi autoclavada durante trinta minutos a 121°C. Foi colocada num recipiente até perfazer uma altura de dois centímetros de forma a simular o ambiente nos aviários. Foi confirmada a ausência de *Salmonella*, coliformes e bacteriófagos. Posteriormente, foi pulverizada com uma suspensão dos dois bacteriófagos com a concentração de 5×10^8 PFU/ml no caso de F1055S e 1×10^{10} PFU/ml para o fago F12013S e foram feitas três recolhas mensais aleatórias das camas. Foi feito o teste de lise pela técnica descrita em 3.2.1.

4.2.4. Sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis em camas infectadas experimentalmente e tratadas com fago F1055S *in vitro*

No laboratório foi simulado o ambiente de um aviário com a finalidade de estudar a eficácia dos dois fagos no tratamento de camas infectadas e comparar com os resultados obtidos *in vivo*.

Uma amostra das camas que são utilizadas em aviário foi autoclavada durante trinta minutos a 121°C. Foram colocadas em seis recipientes até perfazer uma altura de dois centímetros de forma a simular o ambiente nos aviários. Foi confirmada a ausência de *Salmonella*, coliformes e bacteriófagos. Posteriormente, foram pulverizadas com uma suspensão de *Salmonella* Enteritidis com uma concentração de 1×10^5 CFU/ml. Três das caixas foram pulverizadas com o bacteriófago F1055S com a concentração de 1×10^7 PFU/ml e foram feitas três recolhas aleatórias das camas de cada caixa ao primeiro, quarto, sétimo, nono e décimo quinto dias da experiência. Realizaram-se diluições para pesquisa de *Salmonella* (25g em 100ml); retirou-se 1 ml da solução mãe para 9 ml de solução de Ringer e fazem-se diluições sucessivas. Retira-se 100µl de cada diluição, semeia-se em SMID e incuba-se a 37° durante 21 ± 1 horas. No final é feita a contagem das CFU's.

4.2.5. Análise estatística

O programa SPSS 15.0 foi utilizado para a análise dos dados. As diferenças de significância na eficácia do tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis por suspensões fágicas e na eficácia do fago no tratamento de camas infectadas com *Salmonella* Enteritidis *in vitro* foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis, visto que os dados não seguiam uma distribuição normal. Quando foram encontradas diferenças entre os grupos aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, para se detectar grupos que apresentavam diferenças significativas.

4.3. Resultados

4.3.1. Determinação da eficácia do tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis por suspensões fágicas

Dos três grupos de trinta ovos incubados alguns não eclodiram, nove no controlo, seis no grupo teste infectado com *Salmonella* e sete no grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fago.

Os três grupos de pintos que eclodiram dos ovos apresentavam pesos médios diferentes ao fim de oito dias de eclosão. O grupo de pintos resultante dos ovos infectados com *Salmonella* e tratados com a suspensão fágica apresentou um peso médio semelhante ao do grupo controlo (104,2 e 103,81 g, respectivamente), mas o grupo de pintos resultante dos ovos infectados com *Salmonella* não tratados com fago apresentou um peso médio inferior (95,65g) (Tabela 6). O número de pintos com sintomas de infecção; pintos coxos, devido a artrite; e pintos com “pasting” também foi maior no grupo infectado com *Salmonella* relativamente ao controlo e ao grupo teste tratado com fagos (Tabela 6).

No grupo controlo não foi detectada *Salmonella* nos órgãos dos pintos, mas nos outros dois grupos foi detectada quer nos intestinos quer no coração e baço (Tabela 7). A percentagem de pintos com *Salmonella* foi, no entanto, maior para os pintos do grupo de aves infectados com *Salmonella* do que para o grupo de pintos resultante dos ovos infectados com *Salmonella* e tratados com fagos (Tabela 7).

O número de casos de artrites no grupo de pintos controlo foi significativamente diferente do grupo de pintos infectados com *Salmonella* ($p < 0.05$) enquanto que não se

observaram diferenças significativas ($p > 0.05$) entre o grupo controle e o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos. Também se observaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o grupo infectado com *Salmonella* e o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos.

No caso da presença de “pasting” comparando o grupo controle com o grupo infectado com *Salmonella* observaram-se diferenças significativas ($p < 0.05$) enquanto entre o grupo controle e o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos não se observaram diferenças significativas ($p > 0.05$). Entre o grupo infectado com *Salmonella* e o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos observaram-se diferenças significativas ($p < 0.05$).

Quanto à presença de *Salmonella* nos intestinos quando comparados os grupos controle com o grupo infectado com *Salmonella*, controle com o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos e o grupo infectado com *Salmonella* com o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos as diferenças foram sempre significativas ($p < 0.05$).

Quanto à presença de *Salmonella* nos órgãos quando comparados os grupos controle com o grupo infectado com *Salmonella*, o grupo controle e o grupo infectado com *Salmonella* e tratado com fagos observaram-se diferenças significativas ($p < 0.05$). Comparando o grupo infectado com *Salmonella* e infectado com *Salmonella* e tratado com fagos não se observaram diferenças significativas ($p > 0.05$) (Tabela 8).

Tabela 6 – Número total de pintos sobreviventes, peso médio dos pintos, número de pintos com artrites (coxos) e com “pasting” nos três grupos no final da experiência.

Amostras	Nº de pintos	Peso médio (g)	Nº de pintos com artrites	Nº de pintos com “pasting”
Grupo Controle	21	103.81	0	3
Grupo <i>Salmonella</i> + Fago	24	104.20	0	4
Grupo <i>Salmonella</i>	23	95.65	5	14

Tabela 7 – Percentagens de *Salmonella* nos intestinos e noutros órgãos nos três grupos de pintos em teste.

Amostras	Presença de <i>Salmonella</i> nos intestinos	Presença de <i>Salmonella</i> nos órgãos (coração + fígado + baço)
Grupo Controlo	0 %	0 %
Grupo <i>Salmonella</i> + Fago	46 %	88 %
Grupo <i>Salmonella</i>	83 %	100 %

Tabela 8 – Análise estatística com o teste não paramétrico Mann-Whitney das diferenças observadas no número de artrites, “pasting”, presença de *Salmonella* e de fago nos intestinos e nos órgãos (valores de p).

Artrites	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + Fago	“Pasting”	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + Fago
Controlo	0.025	1	Controlo	0.002	0.828
<i>Salmonella</i>		0.017	<i>Salmonella</i>		0.002
<i>Salmonella</i> nos intestinos	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + Fago	<i>Salmonella</i> nos órgãos	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + Fago
Controlo	0	0	Controlo	0	0
<i>Salmonella</i>		0.009	<i>Salmonella</i>		0.083

4.3.2. Determinação do tempo de sobrevivência do fago de *Salmonella* Enteritidis em aviários

Relativamente ao tempo de sobrevivência do fago em aviários, o resultado do teste de lise, depois da aplicação do fago, nas cinco amostras colhidas mensalmente nas camas revelou que no aviário 1 o fago permaneceu durante 120 dias enquanto no aviário 2 permaneceu durante 90 dias. Em ambos os casos o número de amostras positivas começou a diminuir ao fim de 60 dias (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de lise em amostras colhidas mensalmente nas camas dos aviários.
Número de amostras positivas em relação ao número de amostras analisadas.

	Início Dia 0	Dia 1	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150
Aviário 1	0/5	5/5	5/5	4/5	3/5	1/5	0/5
Aviário 2	0/5	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	0/5

4.3.3. Determinação do tempo de sobrevivência do fago de *Salmonella* Enteritidis *in vitro*

Relativamente ao tempo de sobrevivência dos fagos *in vitro*, o resultado do teste de lise, depois da aplicação dos mesmos, nas três amostras colhidas mensalmente das camas revelou que estes permaneceram aí durante 180 dias (Tabela 10).

Tabela 10 – Teste de lise em amostras colhidas mensalmente em camas *in vitro*.
Número de amostras positivas em relação ao número de amostras analisadas.

Periodicidade	Início Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120	Dia 150	Dia 180	Dia 210
Camas esterilizadas	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3

4.3.4. Sobrevivência da *Salmonella* em camas infectadas com *Salmonella* Enteritidis e tratadas com fago F1055S *in vitro*

Em relação à eficácia do fago no tratamento das camas infectadas as contagens de CFU/ml depois da aplicação inicial de *Salmonella* Enteritidis revelaram um aumento da concentração tanto no grupo controlo como no grupo em teste ao quarto dia da experiência; de $3,32 \times 10^5$ para $3,12 \times 10^8$ CFU/ml e de $3,29 \times 10^5$ para $9,3 \times 10^7$ CFU/ml, respectivamente. No sétimo dia os valores foram de $2,32 \times 10^8$ CFU/ml para o grupo controlo e $5,67 \times 10^7$ CFU/ml para o grupo teste. Ao nono dia a concentração de

Salmonella Enteritidis foi de $4,96 \times 10^8$ no caso do grupo controlo e de $2,18 \times 10^7$ CFU/ml no grupo teste. A experiência terminou ao fim de quinze dias e os valores finais foram de $2,11 \times 10^8$ CFU/ml para o grupo controlo e $1,56 \times 10^7$ CFU/ml para o grupo teste (Figura 18).

No grupo tratado com fago comparando o quarto com o sétimo dia da experiência não existiram diferenças significativas ($p > 0.05$) enquanto comparando com o nono e décimo quinto dias já houve diferenças significativas ($p < 0.05$). Comparando o sétimo com o nono e o décimo quinto dias houve diferenças significativas ($p < 0.05$). Comparando o nono com o décimo quinto não existiram diferenças significativas ($p > 0.05$) (Tabela 11).

Comparando o grupo controlo com o grupo tratado com fago no primeiro dia da experiência não existiram diferenças significativas ($p > 0.05$). Estes dois grupos quando comparados entre si ao quarto, sétimo, nono e décimo quinto dias da experiência já revelaram diferenças significativas ($p < 0.05$) (Tabela 12).

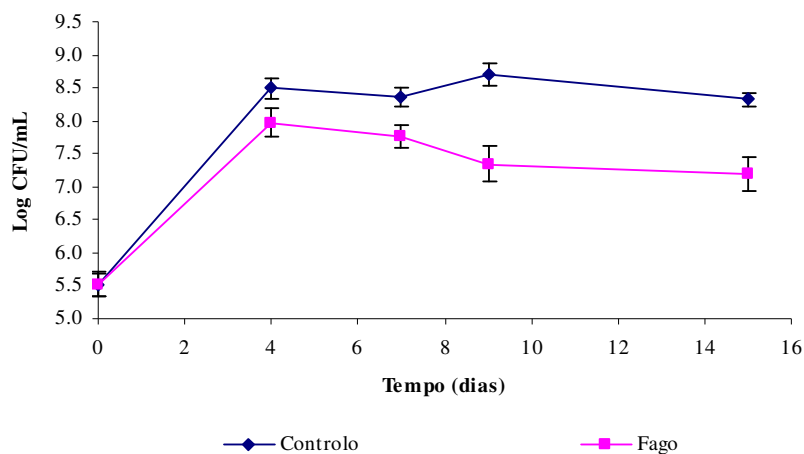


Figura 18 – Variação do teor de *Salmonella* Enteritidis em camas de aviário tratadas com o fago F1055S após infecção com a bactéria. As barras de erro representam o desvio padrão.

Tabela 11 – Análise estatística ao longo do tempo no grupo de aves tratado com fago F1055S, método de Mann-Whitney (valores de p).

Dias	7	9	15
4	0.184	0.005	0.005
7		0.05	0.005
9			0.275

Tabela 12 – Análise estatística entre o grupo de aves controlo e o grupo de aves infectado com *Salmonella* e tratado com fagos ao longo do tempo (15 dias), método de Mann-Whitney.

Dias	Controlo	Fago	p
0	3.32E+05	3.29E+05	1
4	3.12E+08	9.30E+07	0.05
7	2.32E+08	5.67E+07	0.05
9	4.96E+08	2.18E+07	0.05
15	2.11E+08	1.56E+07	0.05

4.4. Discussão

Na determinação da eficácia no tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis por suspensões fágicas no grupo teste tratado com fago obtiveram-se melhores resultados que no grupo infectado com *Salmonella*. No grupo tratado com fagos, os pintos apresentaram maior peso, menor número de pintos coxos e menor número de pintos com pasting ($p < 0.05$). O fago F1055S foi assim eficaz no tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis.

Os testes do tempo de sobrevivência do fago F1055S em aviários mostram que este fago tem uma longa permanência em camas de aviários, mantendo-se num dos aviários durante 90 dias e no outro durante 120 dias. A diferença nos tempos de sobrevivência destes fagos deveu-se provavelmente à diferença de humidade nas camas. Em ambos os aviários o número de amostras positivas começou a diminuir ao fim de 60 dias o que indica que é aconselhável renovar a aplicação do fago de dois em dois meses.

O terceiro ensaio em condições controladas mostra que o tempo de sobrevivência destes fagos atinge mesmo os 180 dias. Este ensaio foi realizado em camas autoclavadas onde não existem outros hospedeiros para o fago e onde factores tais como humidade, pH e temperatura são controlados, o que não acontece nos aviários.

Quanto à sobrevivência da *Salmonella* em camas infectadas com *Salmonella* Enteritidis *in vitro* e tratadas com o fago F1055S o aumento na concentração da *Salmonella* nos primeiros quatro dias da experiência deveu-se provavelmente à multiplicação normal desta bactéria, não existindo diferenças significativas entre os dois grupos. Este aumento foi menor no grupo que tinha sido pulverizado com fago do que no grupo controlo, observando-se diferenças significativas entre estes. O fago F1055S foi assim eficaz no tratamento de camas infectadas com *Salmonella* Enteritidis *in vitro*.

As experiências realizadas, *in vivo* e *in vitro*, mostraram que os fagos F1055S e F12013S podem ser bons candidatos para controlo e terapia das infecções por *Salmonella* Enteritidis em avicultura. Este facto é comprovado por outros estudos que indicaram que a *Salmonella* pode ser controlada através da utilização de bacteriófagos (Fiorentin, 2005a,b). É, no entanto, necessário fazer mais estudos para melhorar a eficácia da terapia fágica para tratamento de infecções por *Salmonella* (Higgins, 2007).

Capítulo 5.

5. Discussão final

Com a problemática crescente das resistências bacterianas e das restrições ao uso de antibióticos na produção animal existe um interesse renovado na utilização de bacteriófagos como alternativa ao uso de antibióticos (Huff *et al*, 2004).

As vantagens dos bacteriófagos quando comparadas com as dos antibióticos incluem a sua especificidade para um dado hospedeiro, crescimento exponencial, baixos custos de produção, ausência de efeitos nas células animais ou vegetais, facilidade de resolver a problemática da resistência, potencial de modificação genética para aumentar a eficácia do bacteriófago e a presença e abundância na natureza (Carlton, 1999; Huff *et al*, 2004).

O largo espectro de aplicações dos fagos na biotecnologia e/ou medicina vão desde a prevenção de doenças (vacinas fágicas), diagnóstico, detecção e identificação de bactérias, tratamento (terapia fágica), entre outras.

Através da “engenharia” fágica, é possível elaborar uma mistura de fagos para tratar diferentes estados de doenças, obtendo-se um efeito tanto profilático como terapêutico (Clark, 2006).

Um dos principais objectivos propostos neste estudo consistiu no isolamento e selecção de bacteriófagos que possuísem elevada percentagem de lise sobre *Salmonella* Enteritidis. Os estudos realizados *in vitro*, mostraram que os fagos seleccionados apresentam grande potencial para serem usados em terapia fágica em avicultura, pois um dos fagos foi activo contra 67% dos isolados testados e o outro contra 78% e a mistura dos dois fagos contra 80%.

Na terapia fágica é importante usar suspensões fágicas concentradas de modo a que o volume a aplicar não seja muito grande. O método de produção de fagos em meio sólido permite a produção de uma maior concentração de fagos que o método de produção em meio líquido. No entanto, o método de produção em meio líquido é mais apropriado para aplicar industrialmente.

Para purificar as suspensões fágicas é importante usar processos que possibilitem uma elevada eficiência de recuperação e remoção de substâncias indesejáveis, como as endotoxinas. Merril *et al* (1996) reportam o sucesso da centrifugação diferencial com

cloreto de cério na diminuição da concentração de endotoxinas em preparações fágicas. A ultracentrifugação tangencial, deverá ser um sistema a explorar em trabalhos futuros de modo a otimizar condições de operação de processos de separação para este tipo de suspensões. Deverá procurar-se o compromisso de eficiência entre a recuperação do fago e o tamanho das substâncias a eliminar. Sugere-se o cálculo da eficiência de retenção do fago na fracção retida do sistema, assim como a quantificação de endotoxinas tanto na fracção retida como na permeada. O nível de toxinas em preparações fágicas pode ser medido quantitativamente através do ensaio do lisado do *Limulus Amebocyte* – LAL (Merril *et al.*, 1996). De acordo com os resultados obtidos deve proceder-se a reajustes no “cut off” da membrana e nas condições de filtração.

Os fagos usados em terapia fágica devem estar bem caracterizados. Numa perspectiva de classificação taxonómica, a identificação morfológica do fago adquiriu relevância. Os resultados apresentados neste trabalho permitiram classificar morfolologicamente os fagos F1055S e F12013S e identificar o grupo taxonómico do qual fazem parte, grupo *Caudovirales*, família *Siphoviridae*. No entanto, os resultados obtidos pela sequenciação vieram confirmar que os dois fagos geneticamente são diferentes e que é possível produzir sondas específicas para cada um dos fagos.

Muitos investigadores administraram fagos por via oral com o intuito de minimizar o efeito das toxinas (Oliveira, 2005). Provavelmente, a administração oral de bacteriófagos torna-se difícil devido às severas condições encontradas no tracto gastrointestinal. Enzimas e condições de pH variáveis são prejudiciais para a estrutura dos fagos.

Com estas experiências *in vitro* e *in vivo* pretende-se adequar à indústria avícola esta terapia. Os fagos F1055S e F12013S permaneceram *in vitro* durante 180 dias nas camas que no laboratório simulam o ambiente nos aviários.

Os resultados das experiências *in vivo* vieram confirmar os das experiências *in vitro*, confirmando que estes fagos conseguem manter-se viáveis durante vários meses em aviários. O tempo de sobrevivência do fago F1055S nos dois aviários foi, no entanto menor (90 e 120 dias) que *in vitro*. Esta diferença pode ser resultado do facto das camas dos aviários serem estruturas dinâmicas, estando sujeitas a condições variáveis de humidade, pH e temperatura.

A eficácia destes fagos na inactivação de *Salmonella* foi mostrada também através da diminuição do teor de *Salmonella* em camas tratadas com fagos relativamente ao

controle, do maior número de pintos com sintomas de salmonelose em ovos infectados do que em ovos infectados sujeitos a terapia fágica e pela menor incidência de *Salmonella* nos órgãos de pintos tratados com fagos. A sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis introduzida em camas infectadas *in vitro* foi menor do que no grupo que tinha sido pulverizado com o fago F1055S do que no grupo controle.

Os bacteriófagos foram eficazes no tratamento de ovos embrionados infectados com *Salmonella* Enteritidis, reduzindo a sua presença em 37% nos intestinos e em 12% no coração, no fígado e no baço.

Será no entanto necessário realizar mais estudos para confirmar a eficácia dos bacteriófagos no controle da *Salmonella* em avicultura.

Capítulo 6.

6. Trabalhos futuros

No que diz respeito a trabalhos consequentes destes estudos preliminares propõe-se numa fase inicial:

1) Estudos da dinâmica dos fagos seleccionados em aves em condições de laboratório, para se inferir quanto a concentrações terapêuticas, vias e modos de administração direccionados para a indústria avícola, nunca descurando a viabilidade económica, a exequibilidade de aplicação e a eficiência de combate à infecção.

2) Quantificação do DNA dos fagos por espectrofluorimetria ou por PCR em Tempo Real;

3) Testar a inocuidade do fago de *Salmonella* Enteritidis *in vivo*;

4) Pesquisar novos fagos activos contra um maior número de isolados de *S. enteritidis* e outros;

5) Purificação de suspensões fágicas /medição de endotoxinas;

6) Testar se a existência de fagos temperados (profagos) em *Salmonella* pode afectar a infecção por fagos líticos similares;

7) Estudos de eficácia de filtração/cálculo da eficiência de retenção do fago;

8) Novos métodos de produção de fagos.

BIBLIOGRAFIA

Abad, J., Llobet, J., Garcia, E., Infesta, P., Barral, A., Martin, E., Garcia, R., Martínez, R., Sauz, A., 2003, Reproducción e incubación en avicultura. Real Escuela de Avicultura.

Barrow, P., Lovell, M., Berchieri, A. J., 1998, Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v.5, n. 3, p. 294-298.

Berchiery Jr., A., Lovell, A., Barrow, P., 1991, The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. Res. Microbiology, v. 142, p. 541-549.

Bogovazova, G., Voroshilova, N., Bondarenko, V., 1991, The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, v. 4, p. 5-8.

Boratyński J., Syper D., Weber-Dabrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Poźniak G., Górski A., 2004, Preparation of endotoxina-free bacteriophages, Cellular and Molecular Biology Letters, v.9, n.2, p. 253-9.

Bradbury, J., 2004, "My enemy's enemy is my friend" – Using phages to fight bacteria. The Lancet, v. 363, p. 624-625.

Carlton, R. M., 1999, Phage Therapy: Past History and Future Prospects. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 47, p. 267-274.

Carter, G., Chengappa, M., Robert, A., 1995, Introductory Virology, Essentials of Veterinary Microbiology. Willians & Wilkins, p. 294-300.

Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S., Brussow, H., 2004, In vitro and vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n°7, p. 2558-2569.

Clark, J. R. and March, J. B., 2006, Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. Trends in Biotechnology, v.24, n.5, p.212-218.

Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P., Swain, R. H. A., 1975, The Enterobacteraceae: Salmonella, *In Medical Microbiology – Volume Two. The Practice of Medical microbiology*, Churchill Livingstone, 12th ed, p. 403-419.

Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., Opolski, A., Weber-dabrowska, Gorski, A., 2005, Bacteriophage penetration in vertebrates. Journal of Applied Microbiology, 98, 7-13.

Fiorentin, L., Vieira, N., Barioni Jr, W., 2003, “*In vivo*” properties of lytic bacteriophages isolate in Salmonella enteritis infected and uninfected chickens, *In Proceedings of the XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association*, p. 161.

Fiorentin, L., Vieira, N. D., Jr, W. B., 2005a, Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. Avian Pathology, v. 34, n. 3, p. 258-263.

Fiorentin, L., Vieira, N.D., Barioni J. W., 2005b, Use of Lytic Bacteriophages to Reduce *Salmonella* Enteritidis in Experimentaly Chicken Cuts. Brazilian Journal of Poultry Science, v. 7, n. 4, p. 255-260.

Fox, R., 1998, Lecture notes for Biology, Viruses. Lander University.

García, E. and López, R., 2002, Los bacteriofagos y sus productos génicos como agents antimicrobianos: Revista Espanola de Quimioterapia, v. 15, n. 4, p. 306-312.

García, V., 2000, Colibacilosis en las granjas avícolas. *E. coli* una oportunista siempre presente, *In Proceedings of the XXXVII Symposium WPSA*, p. 118-122.

Gast, R. K., 1997, *Salmonella* Infections, *In Diseases of poultry*, Iowa State University Press. 10th ed, p. 781-82.

Goode, D. Allen, V. M., Barrow, P. A., 2003, Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n.8, p. 5032-5036.

Goodridge, L. and Abedon, S., 2003, Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry. *Feature Article*. V. 53, n. 6, p. 254-262.

Grabow, W., 2001, Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water, *Water SA*, v. 27, no. 2, p. 251-268.

Guard-Petter, J., 2001, The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology*, n.3, v.7, p.421-430.

Higgins, S.E., Higgins, J.P., Bielke, L.R., Hargis, B.M., 2007, Selection and Application of Bacteriophages for Treating *Salmonella enteritidis* Infections in Poultry. *International Journal of Poultry Science*, v.6, n.3, p.163-168.

Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J., Donogue, A., 2003, Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Science*, v. 82, p. 1108-1112.

Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., Donoghue, A. M. 2004. Bacteriophage: Potential Role in Food Safety, *In Preharvest and Postharvest Food Safety Contemporary Issues and Future Directions*, p. 365-374.

Huff, W. E., Huff, G.R., Rath, N.C., Balog, J.M., Donoghue, A.M., 2005, Alternatives to Antibiotics: Utilization of Bacteriophage to Treat Colibacillois and Prevent Foodborne Pathogens. Poultry Science Association, v. 84, p.655-659.

Humphrey, S., Stanton, T., Jensen, N., Zuerner, R., 1997, Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. Journal of Bacteriology, v. 179, n°2, p. 323-329.

Inal, J. M., 2003, Phage Therapy: a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 51, p. 237-244.

Jensen, E., Shrader, H., Rieland, B., Thompson, T., Lee, K., Nickerson, K., Kokjohn, T., 1998, Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n°2, p. 575-580.

Kaiser, G., 2004, The prokaryotic cell: bacteria, *In* Microbiology Lecture Guide.

Keen, J., 2004, Salmonellosis in Livestock: animal health and public health aspects, Clay Center.

Klovins, J., Overbeek, G., van den Worm, S., Ackermann, H., van Duin, J., 2002, Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. Journal of General Virology, v. 83, p. 1523-1533.

Levine, A., 1992, The bacteriophages, *In* Viruses. Scientific American Library, p. 25-44.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker J., 2003, Brock Biology of Microorganisms, 10th ed., Pearson Education Inc., NJ, USA.

Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, T., 1982, Molecular Cloning: A laboratory manual. CSHL Press, EUA.

Marks, T., Sharp, R., 2000, Bacteriophages and Biotechnology: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 75, p. 6-17.

McLaughlin, M. R., Balaa, M.F., Sims, J., King, R., 2006, Isolation of *Salmonella* Bacteriophages from Swine Effluent Lagoons. J. Environ. Qual., v.35, p.522-528.

McMullin, P., 2004, Salmonellosis, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium infections, In A Pocket Guide to Poultry Health and Disease, 278 pp.

Merril, C., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N., Creep, G., Zullo, S., Adhya, S., 1996, Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. Proc.Natl.Acad.Sci., v. 93, p. 3188-3192.

Morrison, S., Rainnie, D., 2004, Bacteriophage therapy: an alternative to antibiotic therapy in aquaculture? Canadian Technical report of Fisheries and Aquatic Sciences, 2532, p. 1-23.

Nawaz, M., Erickson, B., Khan, A., Khan, S., Pothuluri, J., Rafil, F., Sutherland, J., Wagner, R., Cerniglia, C., 2001, Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial Resistance in the food animal production environment. Regulatory Research Perspectives, v. 1, nº 1, p. 1-10.

Oliveira, R., 1995, Processos de Separação em Engenharia Biológica. Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho.

Oliveira, A., 2005, Utilização de bacteriófagos no controlo de colisepticemias em aves - estudos preliminares. Tese de Mestrado. Universidade do Minho.

Pareja, E., 1998, Curso de Microbiologia General de Enrique Iáñez.

Park, S., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K., Nakai, T., 2000, Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, N°4, p. 1416-1422.

Ronda, C., Vázquez, M., López, R., 2003, Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, v. n°18, p. 3-10.

Rydman, P., Bamford, D., 2003, Identification and mutational analysis of bacteriophage PRD1 holin P35. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n.13, p. 3795-3803.

Saeed, A.M., Thiagarajan, D., Asem, E., 1999, Mechanism of Transovarian Transmission of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Laying Hens, *In Salmonella Enterica Serovar Enteritidis in Humans and Animals*. *Epidemiology, Pathogenesis and Control*, 464 pp.

Santelli, R. and Navarro-Cattapan, L., 2000, A simplified CsCl protocol for lambda DNA purification: no enzymatic treatment/one phenol extraction. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n°1, p. 65-66.

Skalar, B. and Joerger, R., 2001, Attempts to utilize bacteriophages to combat *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in chickens. *Journal of Food safety*, v. 21, p. 15-29.

Skurnik, M. and Strauch, E., 2006, Phage Therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, p. 5-14.

Skurnik, M., Pajunen, M., Kiljunen, S., 2007, Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*, v. 29, p.995-1003.

Smith, H. and Huggins, M., 1982a, Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology*, v. 129, p. 2659-2675.

Smith, H. and Huggins, M., 1982b, Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Journal of General Microbiology*, v. 128, p. 307-318.

Smith, H., Huggins, M., Shaw, K., 1987, The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *Journal of General Microbiology*, v. 133, p. 1111-1126.

Snoeyenbos, G. H., 1997, Salmonellosis, *In Diseases of poultry*, Iowa State University Press. 10th ed, p. 72.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, Jr, J.G., 2001, Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, n.3, p.649-659.

Vasala, A., 2000, Characterization of *Lactobacillus* bacteriophage LL-H genes and proteins having biotechnological interest. Department of Biology Oulu University Library.

Verthé, K., Possemiers, S., Boon, N., Vaneechoutte, M., Verstraete, W., 2004, Stability and activity of an *Enterobacter aerogenes*-specific bacteriophage under simulated gastrointestinal conditions. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v. 65, p. 465-472.

Villate, D., 1997, Maladies des volailles. Editions France Agricole, p. 242-257.

Waddell, T., Mazzocco, A., Pacan, J., Ahmed, R., Johnson, R., Poppe, C., Khakhria, R.. 2002, Use of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O 157. Patent 20020090356. EUA.

Wagner, P., Martinez, J., 1999, *In Basic Virology*. Blackwell Science, Inc, 466 pp.

Wang, I., Smith, D., Young, R., 2000, Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 799-825.

Yamamoto, K., Alberts, B., 1970, Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology*, v. 40, p. 734.

Young, R., Wang, I., Roof, W., 2000, Phages will out: strategies of host cells lysis. *Trends in Microbiology*, v. 8, n.3, p. 120-128.

ANEXOS

Anexo A

Tabela A.1 – Resistência dos isolados de *Salmonella* a antibiótico.

Antibiótico	Número de estirpes	Estirpes resistentes	% Estirpes resistentes
Amoxiciclina+Ac.Clav.	433	41	9.5%
Amoxiciclina	415	98	23.6%
Ampicilina	509	133	26.1%
Apramicina	509	37	7.3%
Cloranfenicol	397	35	8.8%
Colistina	485	72	14.8%
Doxiciclina	509	417	81.9%
Eritromicina	509	505	99.2%
Cefotiofur	268	15	5.6%
Enrofloxacina	509	63	12.4%
Lincomicina	509	504	99%
Neomicina	346	12	3.5%
Ac. Nalidixico	500	322	64.4%
Ac. Oxolinico	265	163	61.5%
Ac. Pipemidico	411	83	20.2%
Rifampicina	508	418	82.3%
Estreptomicina	423	72	17%
Trimetropim X Sufas	508	176	34.6%
Tetraciclina	509	227	44.6%
Flumequina	509	117	23%

Tabela A.2 – Resistência múltipla dos isolados de *Salmonella* Enteritidis a antibióticos.

Resistências simultâneas a antibióticos do serótipo <i>S. enteritidis</i> :	Nº Estirpes	% Estirpes
Amoxicilina+Ac.Clav. e Ampicilina	15	4.7%
Amoxicilina+Ac.Clav e Enrofloxacina	6	1.9%
Amoxicilina+Ac.Clav e Trimetropim X Sufas	13	4.1%
Amoxicilina e Ampicilina	48	15.2%
Ampicilina e Enrofloxacina	14	4.4%
Amoxicilina e Trimetropim X Sufas	32	10.1%
Ampicilina e Enrofloxacina	16	5.1%
Ampicilina e Trimetropim X Sufas	38	12.0%
Enrofloxacina e Trimetropim X Sufas	23	7.3%
Amoxicilina e Amoxicilina+Ac.Clav. e Ampicilina	13	4.1%
Amoxicilina e Amoxicilina+Ac.Clav. e Enrofloxacina	6	1.9%
Amoxicilina e Amoxicilina+Ac.Clav e Trimetropim X Sufas	10	3.2%
Ampicilina e Amoxicilina+Ac.Clav. e Enrofloxacina	6	1.9%
Ampicilina e Amoxicilina e Trimetropim X Sufas	10	3.2%
Amoxicilina+Ac.Clav. e Enrofloxacina e Trimetropim X Sufas	5	1.6%
Amoxicilina+Ac.Clav, Amoxicilina, Ampicilina, Enrofloxacina	6	1.9%
Amoxicilina, Amoxicilina+Ac.Clav., Ampicilina e Trimetropim X Sufas	9	2.8%
Amoxicilina, Ampicilina, Enrofloxacina, Trimetropim X Sufas	12	3.8%
Amoxicilina+Ac.Clav, Amoxicilina, Ampicilina, Enrofloxacina, Trimetropim X Sufas	5	1.6%